

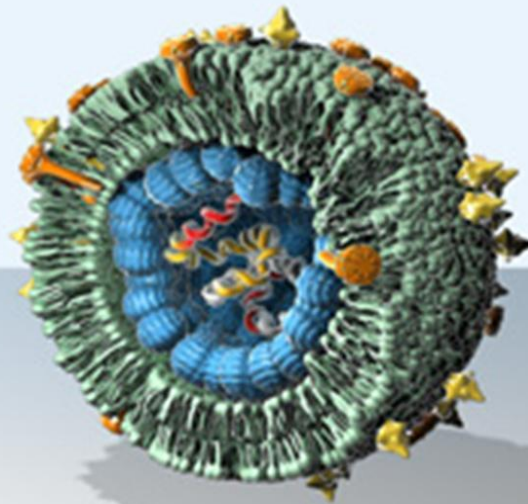


**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Α' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΝΟΣΩΝ
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ «ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΥΓΓΡΟΣ»**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΑΝΤΩΝΙΟΥ

**Επιδημιολογία της λοίμωξης από τον
ιό της ηπατίτιδας C σε ασθενείς
κλινικής σεξουαλικά
μεταδιδόμενων νοσημάτων και AIDS**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΥΡΣΙΝΗ ΒΟΥΝΑΤΣΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ Ε.Κ.Π.Α**

ΑΘΗΝΑ 2014

| | |
|---|-------------------|
| Ημερομηνία αιτήσεως: | 26.05.1993 |
| Ημερομηνία ορισμού 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: | 12.07.1994 |
| Ημερομηνία ορισμού του θέματος: | 21.02.1995 |
| Ημερομηνία αλλαγής 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: | 05.06.2012 |
| Ημερομηνία τροποποίησης θέματος: | 09.11.2012 |
| Ημερομηνία κατάθεσης 1ης προόδου: | 20.06.2012 |
| Ημερομηνία κατάθεσης 2ης προόδου: | 02.11.2012 |
| Ημερομηνία κατάθεσης 3ης προόδου: | 26.07.2013 |
| Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: | 06.05.2014 |

ΜΕΛΗ ΤΗΣ 3ΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- 1. Επιβλέπουσα: Ηλέκτρα Νικολαΐδου,** Επίκουρη Καθηγήτρια Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων νόσων, Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός».
- 2. Αργυρώ Χατζηϊωάννου,** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων νόσων, Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός».
- 3. Αλέξανδρος Στρατηγός,** Καθηγητής Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων νόσων, Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός».

ΜΕΛΗ ΤΗΣ 7ΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

- 1. Ηλέκτρα Νικολαΐδου (επιβλέπουσα):** Επίκουρη Καθηγήτρια Α΄ Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων νόσων, Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός».
- 2. Αργυρώ Χατζηϊωάννου:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων νόσων, Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός».
- 3. Αλέξανδρος Στρατηγός:** Καθηγητής Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων νόσων, Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός».
- 4. Χριστίνα Αντωνίου:** Καθηγήτρια – Διευθύντρια Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων νόσων, Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός».
- 5. Γεωργία Αυγερινού:** Καθηγήτρια Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων νόσων, Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός».
- 6. Αλεξάνδρα Κατσαρού:** Καθηγήτρια Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής Δερματικών και Αφροδισίων νόσων, Νοσοκομείο «Ανδρέας Συγγρός».
- 7. Βιολέττα Καψιμάλη:** Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ανοσολογίας Λοιμώξεων, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών.

Βαθμός Διατριβής: Λίαν Καλώς

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής:

Καθηγητής Μελέτιος-Αθανάσιος Δημόπουλος

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα».

(Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παρ.2)

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν καὶ Ἀσκληπιὸν καὶ Ὑγίαν καὶ Πανάκειαν καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, Ἰστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσεσθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην Ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσεσθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσεσθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφεοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασι τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδέ φάρμακον οὐδενί αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδέ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε· ὁμοίως δὲ οὐδέ γυναικί πεσσόν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δε καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμόν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δε οὐδέν μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δε ἐργάτησιν ἀνδράσιν πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δε ὀκόσας ἄν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτός ἐών πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρείων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἄν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρῆ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι καὶ μὴ ξυγχέοντι εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης, δοξαζομένῳ παρά πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον· παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκέοντι, τάναντία τουτέων.

«Ὀρκίζομαι στον Ἀπόλλωνα τον Ἰατρό και στον Ἀσκληπιό και στην Ὑγία και στην Πανάκεια και σ' ὄλους τους θεοὺς επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατὰ τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον ὄρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ἴσο με τους γονεῖς μου και να μοιραστῶ μαζί μου τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν ἔχει ἀνάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ἴσους με τ' ἀδέλφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές ὅλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους ἄλλους μαθητές που ἔχουν κάνει γραπτὴ συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που ἔχουν ορκισθεῖ στον ἰατρικὸ νόμο και σε κανέναν ἄλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατὰ τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ἢ να τους ἀδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, ἔστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, οὔτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ὁμοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωὴ μου και την τέχνη μου καθαρὴ και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες ἀπὸ λίθους ἀλλὰ ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ' ὅποια σπία κι αν μπω, να μπω για την ὠφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια ἀδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναῖκες και με ἄνδρες, ἐλεύθερους και δούλους. Και ὅ,τι δω ἢ ἀκούσω κατὰ την ἀσκηση του επαγγέλματός μου, ἢ κι εκτός, για τη ζωὴ των ἀνθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεῖ, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον ὄρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, εἴθε ν' απολαύσω για πάντα την ἐκτίμηση ὄλων των ἀνθρώπων για τη ζωὴ μου και για την τέχνη μου, αν ὁμως παραβῶ και αθετήσω τον ὄρκο μου να υποστῶ τα ἀντίθετα ἀπὸ αυτά».

*Στους γονείς μου
και στον γιο μου*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ,

Την καθηγήτρια κυρία Χριστίνα Αντωνίου που με εμπιστεύθηκε, με ενθάρρυνε και με υποστήριξε ώστε να ολοκληρώσω την παρούσα διατριβή.

Την επιβλέπουσα επίκουρη καθηγήτρια κυρία Ηλέκτρα Νικολαΐδου για την προθυμία της να αναλάβει την παρούσα εργασία και για την καθοδήγηση και επίβλεψή της σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Την αναπληρώτρια καθηγήτρια κυρία Αργυρώ Χατζηϊωάννου για τις συμβουλές της και την συμπαράστασή της.

Τον καθηγητή κύριο Αλέξανδρο Στρατηγό που με την φυσική του ευγένεια και την υψηλού επιπέδου επιστημονική του κατάρτιση στάθηκε δίπλα μου και με τις εύστοχες υποδείξεις του μου προσέφερε πολύτιμη βοήθεια.

Ευχαριστώ τις καθηγήτριες κ.κ. Γεωργία Αυγερινού, Αλεξάνδρα Κατσαρού που μου έκαναν την τιμή να συμμετέχουν στην επταμελή επιτροπή με μεγάλη προθυμία και ευχαρίστηση.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ την επίκουρη καθηγήτρια Βιολέττα Καψιμάλη που στάθηκε δίπλα μου σε όλα τα βήματα της προσπάθειάς μου.

Θερμές ευχαριστίες στον φίλο Βασίλη Παπαρίζο, δερματολόγο-αφροδισιολόγο, διευθυντή ΕΣΥ και υπεύθυνο της ΜΕΛ του νοσοκομείου «Ανδρέας Συγγρός» για τη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθειά του.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω από καρδιάς την φίλη πιά κυρία Μάρθα Κατσαρού-βιολόγο που ήταν εκεί όποτε την χρειάστηκα ψυχικά, ηθικά και ουσιαστικά.

Ιδιαίτερη μνεία στη φίλη Λωρέττα Ατσωνίου (και την οικογένειά της) που με την υποστήριξή της και την πολύτιμη βοήθειά της η παρούσα εργασία έφτασε στην τελική της μορφή. Έτσι είναι οι φίλοι! Ευχαριστώ Λωρέττα, Ανδρέα, Θέμη, Γιώργο.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφερθώ στον αείμνηστο καθηγητή Ιωάννη Στρατηγό που με στήριξε στα πρώτα μου βήματα, μου δίδαξε την αξία της δημιουργίας και την αφοσίωση στην επιστήμη.

Οι πιο θερμές ευχαριστίες στους γονείς μου που μου έμαθαν τις αρχές της ζωής, που με πίστευαν και με υποστήριζαν πάντα. Στην μοναδική μου αδελφή που στάθηκε δίπλα μου όπως μόνο εκείνη ξέρει να κάνει, από την αρχή της προσπάθειάς μου, υπερβάλλοντας τις δυνάμεις της.

Τέλος ευχαριστώ τον γιό μου που αν και μικρούλης έδειξε μεγάλη υπομονή και κατανόηση. Ευχαριστώ Νικόλα μου!!!

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΠΟΥΔΕΣ

Πτυχίο Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Πτυχιική εργασία στο τμήμα της Οργανικής Χημείας με θέμα “Εισαγωγή στη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δύο διαστάσεων”.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλικά
- Γαλλικά
- Ιταλικά

ΘΕΣΗ

- Εργάζομαι στο Νοσοκομείο “ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΥΓΓΡΟΣ” από το 1991.
- Υπεύθυνη Χημικός στο Εργαστήριο Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων και AIDS του Νοσοκομείου “ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΥΓΓΡΟΣ”.
- Υπεύθυνη Βιοχημικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου “ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΥΓΓΡΟΣ”.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- Συμμετοχή στο Πρόγραμμα Εκπαίδευσης του Νοσοκομείου “ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΥΓΓΡΟΣ” για φοιτητές Ιατρικής Σχολής, Ειδικευόμενους Δερματολογίας και Ειδικευόμενους Μικροβιολογίας.
- Εκπαιδύτρια-καθηγήτρια Ανοσολογίας-Μικροβιολογίας σε Δημόσιο ΙΕΚ.

ΕΡΓΑΣΙΕΣ – ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα και AIDS**
Μ. Βουνάτσου, Β. Παπαρίζος, Ν. Ζακοπούλου, Ε. Παπαδογιωργάκη, Ν. Σταυριανέας, Μ. Χατζηβασιλείου, Ι. Δ. Στρατηγός.
4ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων, Αθήνα, 4-7 Φεβρουαρίου 1993. Βιβλίο Περιλήψεων σ.67

- **Ψευδώς θετικές οροαντιδράσεις σύφιλης σε HIV ασθενείς.**
 Παπαρίζος Β, Κυριάκης Κ, Εξαδακτύλου Δ, Βουνάτσου Μ, Λόυο Κ, Κουρκουντή Σ, Χατζηβασιλείου Μ.
 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, Αθήνα, 11-13 Νοεμβρίου 2004. Βιβλίο Περιλήψεων σ.111
- **Επίδραση της σύφιλης στους δείκτες της HIV λοίμωξης**
 Β. Παπαρίζος, Ε. Δασκαλάκης, Α. Σαρακηνός, Σ. Κουρκουντή, Μ. Βουνάτσου, Κ. Κυριάκης, Χ. Αντωνίου
 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, Αθήνα, 23-25 Νοεμβρίου 2012, ανακοίνωση ΕΑ04, βιβλίο περιλήψεων σ.11
- **HIV infection and syphilis: clinical and laboratory study in 178 patients.**
 Paparizos V, Hatzivasiliou M, Botsi C, Vounatsou M, Stavrianeas N, Varelzidis A, Stratigos J.
 Spring meeting of the Medical Society for the study of Venereal Diseases (MSSVD), in association with the Hellenic Scientific Society for the study of AIDS and sexually transmitted diseases. Athens, 14-17 May 1998. Book of abstracts p.53
- **Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα και HIV-λοίμωξη**
 Μ.Χατζηβασιλείου, Κ.Κυριάκης, Β.Παπαρίζος, Μ.Βουνάτσου, Ε.Φραγκούλη, Μ.Παπαγεωργίου, Ν.Σταυριανέας, Α.Κατσάμπας, Ι.Δ.Στρατηγός
Ελλ. Επιθεώρηση Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας 1999, Τόμος 10 (suppl.1), σελ. 57-62
- **Αντιμολιβαδικά αντισώματα σε άρρηνες ομοφυλοφίλους, εξετασθέντες σε STD εργαστήριο**
 Γ.Ζήρος, Ε.Παπαδογεωργάκη, Μ.Βουνάτσου, Μ.Χατζηβασιλείου.
- **Ανακοινώσεις στο 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων.**
 Αθήνα Φεβρουάριος 1993.
- **Ανακοινώσεις και poster σε Πανελλήνια Συνέδρια Κυτταρομετρίας.**

ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ-ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Μοριακές Τεχνικές.
- Συμμετοχή σε εκπαιδευτικά σεμινάρια στην Ελλάδα και το Εξωτερικό (Κυτταρομετρία Ροής, AIDS, Έλεγχος Ποιότητας Εργαστηρίων, Θέματα Κλινικής Χημείας-Μοριακής Χημείας-Βιολογίας-Ηπατολογίας, Διοίκησης Εργαστηρίων, κ.α.).
- Εκπαίδευση στο χειρισμό συγχρόνου τεχνολογίας εργαστηριακών αναλυτών (ανοσοενζυμικού, βιοχημικού, μοριακής τεχνολογίας).
- Εκπαίδευση και χειρισμός συστήματος μηχανογράφησης κλινικού εργαστηρίου.

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Συνεργασία και συμμετοχή, επί επταετία, σε Ευρωπαϊκό Πρωτόκολλο με θέμα “ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ AIDS ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΛΛΑ ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΩΣ ΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ” (European Networks for the Surveillance of HIV Infections in Sentinel Populations of STD Patients).

- Παρακολούθηση και συμμετοχή από το 1991 έως και σήμερα σε Εθνικά, Ευρωπαϊκά και Διεθνή Σεμινάρια και Συνέδρια με ανακοινώσεις και εργασίες.
- Μέλος Οργανωτικών και Επιστημονικών Επιτροπών Διοργάνωσης Συνεδρίων (Ελληνική Εταιρία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας, Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας, Ελληνική Εταιρεία Μελέτης και Αντιμετώπισης του AIDS, Ελληνική Επιστημονική Εταιρεία Έρευνας AIDS και Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων κ.α.) και ομιλήτρια σε ομόλογα Συνέδρια.
- Μέλος Επιστημονικών Επιτροπών του ΚΕΕΛ (νυν ΚΕΕΛΠΙΝΟ) και συγγραφή επιστημονικών εκδόσεων του ιδίου Κέντρου.
- Διοργάνωση Ημερίδων, Σεμιναρίων και Workshops.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | ΣΕΛ |
|--|------------|
| ΣΚΟΠΟΣ | 14 |
| A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 15 |
| 1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΤΩΝ ΙΩΝ | 16 |
| 1.1. Ορισμός και γενικά χαρακτηριστικά..... | 16 |
| 1.2. Δομή..... | 17 |
| 2. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C | 18 |
| 2.1. Ιός Ηπατίτιδας C..... | 18 |
| 2.1.α. Κωδικοποιούσα περιοχή του ιού..... | 19 |
| 2.1.β. Δομικές πρωτεΐνες..... | 20 |
| 2.1.γ. Μη δομικές πρωτεΐνες | 21 |
| 2.2. Γενετική Ετερογένεια..... | 22 |
| 2.2.α. Γονότυποι και γεωγραφική κατανομή τους..... | 23 |
| 2.3. Επιδημιολογία..... | 27 |
| 2.4. Φυσική Ιστορία..... | 30 |
| 3. ΣΥΛΛΟΙΜΩΞΕΙΣ | 35 |
| 3.1. Συλλοίμωξη με ηπατοτρόπους ιούς..... | 36 |
| 3.2. Συλλοίμωξη με ιούς μη ηπατίτιδας..... | 38 |
| 3.3 Άλλα είδη συλλοιμώξεων με HCV..... | 38 |
| 4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΠΡΟΛΗΨΗ | 40 |
| B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 42 |
| ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 43 |
| 1. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C | 44 |
| 1.1. Ανίχνευση HCV αντισωμάτων με μικροσωματιδιακή ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας..... | 45 |
| 1.2. Ανίχνευση HCV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση..... | 48 |
| 1.3. Ανίχνευση HCV με μοριακές τεχνικές..... | 54 |
| 1.3.α. Προσδιορισμός HCV RNA – bDNA | 54 |
| 1.3.β. Προσδιορισμός HCV mRNA RT-PCR | 66 |
| 1.4. Στατιστική μέθοδος επεξεργασίας | 71 |

| | |
|---|-----|
| 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 74 |
| 2.1. <i>Εισαγωγή</i> | 74 |
| 2.2. <i>Ιστογράμματα ποσοστιαίας κατανομής ανά κατηγορία</i> | 75 |
| 2.2.α. <i>Ποσοστιαία κατανομή Χρήσης Τοξικών Ουσιών</i> | 75 |
| 2.2.β. <i>Αναλογία συνύπαρξης HCV με ΣΜΝ</i> | 76 |
| 2.2.γ. <i>Ποσοστιαία κατανομή ανά Ηλικία</i> | 78 |
| 2.2.δ. <i>Ποσοστιαία κατανομή ανά Φύλο</i> | 79 |
| 2.2.ε. <i>Ποσοστιαία κατανομή ανά Μορφωτικό Επίπεδο</i> | 80 |
| 2.2.ζ. <i>Ποσοστιαία κατανομή ανά Καταγωγή</i> | 83 |
| 2.2.η. <i>Ποσοστιαία κατανομή ανά Σεξουαλικό Προσανατολισμό</i> | 85 |
| 2.2.θ. <i>Ποσοστιαία κατανομή ανά Αριθμό Συντρόφων το τελευταίο εξάμηνο</i> | 86 |
| 2.2.ι. <i>Ποσοστιαία κατανομή Χρήσης Προφυλακτικού</i> | 87 |
| 2.2.κ. <i>Ποσοστιαία κατανομής μεταβλητής Οικονομικός Πρόσφυγας</i> | 89 |
| 3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΣΙΑΣ HCV ΜΕ ΑΛΛΑ ΣΜΝ ΑΝΑ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ | 91 |
| 3.1. <i>Γενικά</i> | 91 |
| 3.2. <i>HCV με άλλα ΣΜΝ και Φύλο</i> | 92 |
| 3.3. <i>HCV με άλλα ΣΜΝ και Μορφωτικό Επίπεδο</i> | 93 |
| 3.4. <i>HCV με άλλα ΣΜΝ και Καταγωγή</i> | 94 |
| 3.5. <i>HCV με άλλα ΣΜΝ και Σεξουαλικός Προσανατολισμός</i> | 95 |
| 3.6. <i>HCV με άλλα ΣΜΝ και Αριθμός Συντρόφων το τελευταίο εξάμηνο</i> | 96 |
| 3.7. <i>HCV με άλλα ΣΜΝ και Χρήση Προφυλακτικού</i> | 97 |
| 3.8. <i>HCV με άλλα ΣΜΝ και Χρήση Τοξικών Ουσιών</i> | 99 |
| 3.9. <i>HCV με άλλα ΣΜΝ και Μεταβλητή Οικονομικός Πρόσφυγας</i> | 100 |
| 3.10 <i>HCV με άλλα ΣΜΝ και Ηλικία</i> | 101 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 103 |
| 4.1. <i>Συζήτηση αποτελεσμάτων</i> | 103 |
| 4.2. <i>Συμπεράσματα</i> | 111 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 113 |
| SUMMARY | 115 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 117 |

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσης διατριβής είναι η καταγραφή και αξιολόγηση των δημογραφικών και άλλων επιδημιολογικών παραμέτρων ασθενών με ηπατίτιδα-C και η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης των παραμέτρων αυτών με την HCV λοίμωξη, ούτως ώστε να δημιουργηθεί μία επιδημιολογική βάση, τα δεδομένα της οποίας πιθανόν να μπορούν να καταγράψουν ή να διαμορφώσουν την πορεία-εξέλιξη της νόσου. Επίσης, η αναζήτηση πιθανής σύνδεσης συμπεριφορών υψηλού κινδύνου με τη μόλυνση από HCV, αφ'εαυτής αλλά και ως συστατικού γενικότερης συμπεριφοράς υγείας.

Ειδικότερα μελετάται η συσχέτιση με την HCV λοίμωξη ατομικών δημογραφικών στοιχείων όπως φύλο, φυλή, ηλικία, εθνικότητα, κοινωνικό και μορφωτικό επίπεδο, αλλά και στοιχείων ατομικής συμπεριφοράς, όπως η χρήση ενδοφλεβίων εξαρτησιογόνων ουσιών, ο σεξουαλικός προσανατολισμός, ο αριθμός ερωτικών συντρόφων, η χρήση ή μη προφυλακτικού και το ιστορικό-παρουσία άλλων Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων.

Το υλικό της διατριβής αυτής, προκύπτει από τα αρχεία του Κέντρου Ελέγχου και Αναφοράς Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων και AIDS του Νοσοκομείου “ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΥΓΓΡΟΣ”. Η ανάλυση και η αξιοποίηση των αρχείων, σχεδόν δεκαετίας του Τμήματος αυτού, καθώς και η επεξεργασία και η ερμηνεία αυτών, συνεισφέρουν σε μία πλήρη εικόνα επιδημιολογίας της ηπατίτιδας C στην Ελλάδα, πράγμα που είναι και ο σκοπός της διατριβής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΤΩΝ ΙΩΝ

1.1. Ορισμός και γενικά χαρακτηριστικά

Οι ιοί αποτελούν μία μη αυτοτελή μορφή ζωής και χαρακτηρίζονται από πολύ απλές κυτταρικές δομές, που τους κατατάσσουν, ανάμεσα στο όριο των αυτόνομων έμβιων συστημάτων, και των μη ζώντων δομών. Το νουκλεϊκό οξύ των ιών μπορεί να υπάρχει και σε αδρανή μορφή σε αντίθεση με αυτό των ευκαρυωτικών κυττάρων που βρίσκεται πάντα σε ενεργό κατάσταση. Γενικά οι ιοί χαρακτηρίζονται ως μικροοργανισμοί που αναγνωρίζονται από την ιδιαίτερη σύστασή τους, την απλή κυτταρική οργάνωση και τον μηχανισμό αναπαραγωγής τους (ενδοκυττάρια παράσιτα). **Οι ιοί διαχωρίζονται από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς βάσει τριών χαρακτηριστικών:**

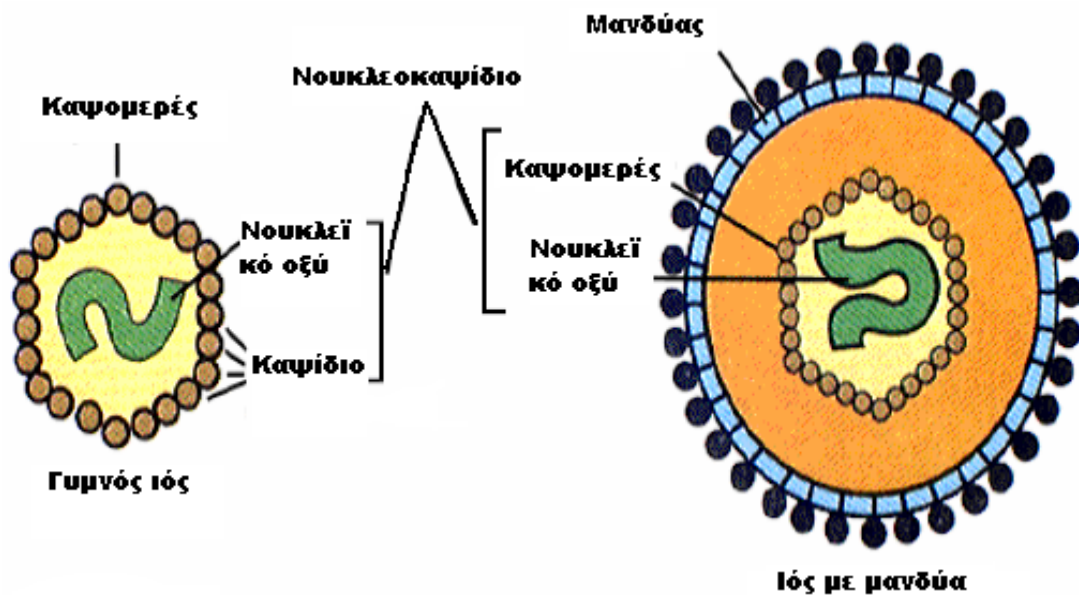
1. **το μέγεθος:** οι ιοί είναι δέκα έως εκατό φορές μικρότεροι από τα περισσότερα βακτηριδιακά κύτταρα. Το μέγεθός τους κατά προσέγγιση κυμαίνεται από 20 έως 300 nm, ενώ το μήκος τους από 20 έως 14.000 nm.
2. **το νουκλεϊκό οξύ (δηλαδή το είδος του γενετικού υλικού):** οι ιοί περιέχουν ένα τύπο νουκλεϊκού οξέως, DNA ή RNA, που περικλείεται από ένα πρωτεϊνικό μανδύα ή περίβλημα (envelope). Χαρακτηριστική ιδιότητα κάποιων ιών π.χ. ηπατίτιδας C, γρίπης και ιλαράς, είναι ότι το γενετικό τους υλικό είναι μόνο το RNA. Οι ιοί, οι οποίοι έχουν ανακαλυφθεί έως σήμερα, δεν περιέχουν ποτέ και τα δύο είδη νουκλεϊκών οξέων στο σωματίδιό τους.
3. **τις μεταβολικές ιδιότητες:** οι ιοί αδυνατούν να συνθέσουν τις δικές τους πρωτεΐνες και να αναπαράγουν το γενετικό τους υλικό, καθώς, λόγω της πολύ απλής τους δομής, δεν έχουν δικούς τους μεταβολικούς μηχανισμούς. Έτσι λοιπόν, για να αναπαραχθούν, χρησιμοποιούν την ενέργεια, καθώς και όλα τα συστήματα αναπαραγωγής των κυττάρων που έχουν μολύνει (και καλούνται ξενιστές). Η αναπαραγωγή των ιών έχει συχνά σαν αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου ξενιστή, ενώ ο βαθμός εξάρτησης του κάθε ιού από το κύτταρο-ξενιστή διαφέρει. Όσα περισσότερα γονίδια έχουν οι ιοί, τόσο μικρότερη είναι και η εξάρτησή τους από το κύτταρο-ξενιστή. Η παραγωγή νέων ιών έχει συνήθως ως

αποτέλεσμα την καταστροφή του κυττάρου-ξενιστή, τη διάδοση σωματιδίων του ιού σε άλλα κύτταρα-ξενιστές και τέλος την εμφάνιση της ασθένειας στον ιστό του ξενιστή [1, 2].

1.2. Δομή

Τα βασικά μέρη της δομής των ιών είναι το νουκλεϊκό οξύ (*DNA, RNA*) το οποίο καλύπτεται από πρωτεϊνικό περίβλημα, το καψίδιο. Το νουκλεϊκό οξύ, μαζί με το καψίδιο, καλείται νουκλεοκαψίδιο, και μπορεί να είναι, είτε γυμνό, είτε να περιβάλλεται από περίβλημα. Η δομή του νουκλεοκαψιδίου κατατάσσει τους ιούς σε διάφορες κατηγορίες. Σε κάθε ιό υπάρχουν περισσότερα από ένα πανομοιότυπα μόρια πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους. Τα επιμέρους πρωτεϊνικά μόρια του καψιδίου καλούνται καψομερή. Τα καψομερή διατάσσονται στο χώρο, είτε ελικοειδώς, είτε σφαιρικά, και στις δύο περιπτώσεις έχουν κανονικά γεωμετρικά σχήματα, που η δομή τους καθορίζεται από τις πρωτεΐνες.

Οι ιοί με περίβλημα έχουν δομή σφαιρική. Όταν το νουκλεοκαψίδιο των ιών αυτών έχει ελικοειδή συμμετρία καλούνται ιοί ελικοειδούς συμμετρίας με περίβλημα, ενώ εκείνοι που έχουν σφαιρική συμμετρία καλούνται πολυεδρικοί ιοί με μανδύα.



Εικόνα 1.2.1.: Δομή των δύο τύπων ιών με και χωρίς μανδύα (περίβλημα)

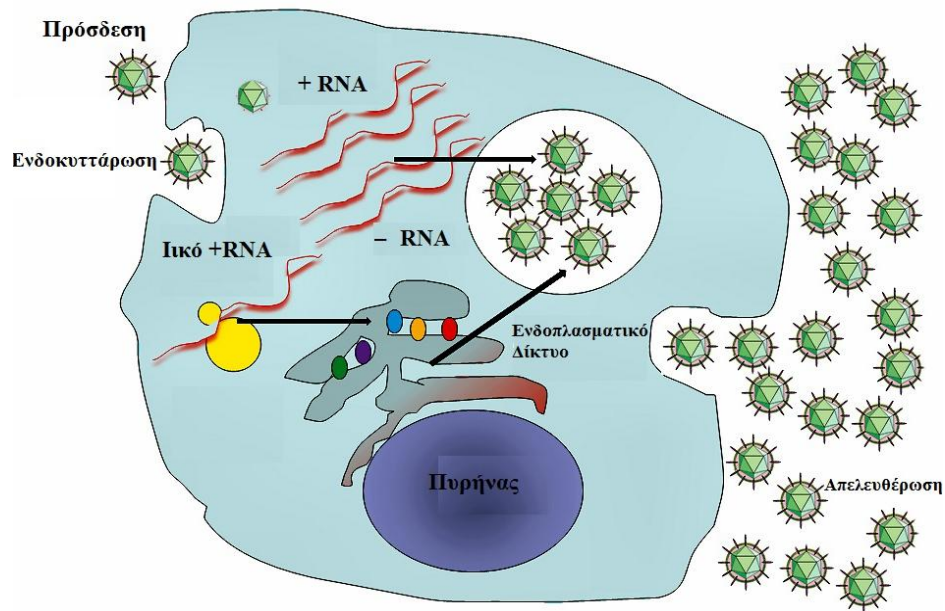
2. ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C

2.1. *Ιός Ηπατίτιδας C*

Ο HCV συγκαταλέγεται στους RNA ιούς και πιο συγκεκριμένα ταξινομείται στο γένος hepacivirus της ευρύτερης οικογένειας των Flaviviridae [3, 4, 5]. Το περίβλημα του είναι σφαιρικό, με διάμετρο 50 nm και αποτελείται από 2 πρωτεΐνες: ένα νουκλεοκαψίδιο και ένα γονιδίωμα μονής RNA αλυσίδας (single-stranded virus) θετικής πολικότητας.

Ο κύκλος ζωής του HCV ξεκινά μέσω της αλληλεπίδρασης του με το κύτταρο-ξενιστή και ολοκληρώνεται με την απελευθέρωση του από αυτό μέσω εξωκυττάρωσης [6]. Πιο αναλυτικά, ο ιός αρχικά συνδέεται με τον ειδικό υποδοχέα που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή, γεγονός που οδηγεί στην ενδοκυττάρωση του ιικού σωματιδίου και στη σύντηξη της ιικής μεμβράνης. Εν συνεχεία, ακολουθεί η απελευθέρωση του ιικού RNA και η μεταγραφή του, με σκοπό να σχηματιστεί ένας συμπληρωματικός κλώνος RNA αρνητικής πολικότητας, ο οποίος θα αποτελέσει μητρικό μόριο για τη δημιουργία ενός RNA κλώνου θετικής πολικότητας. Οι επακόλουθες διαδικασίες μετάφρασης και επεξεργασίας μέσω ειδικών πρωτεϊνών καταλήγουν σε ώριμες δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες, υπεύθυνες για τη συναρμολόγηση νέων ιικών σωματιδίων και την αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού, αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η αντιγραφή του ιικού RNA πραγματοποιείται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου, ενώ η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται με τη μετάβαση των ιικών σωματιδίων σε μεμβρανικά κυστίδια και τη μεταφορά τους στην κυτταρική επιφάνεια για εξωκυττάρωση.

Στην εικόνα 2.1.1. αποτυπώνεται η αρχή του κύκλου ζωής του ιού μέσα στο κύτταρο-ξενιστή (που συνήθως είναι τα ηπατικά κύτταρα, αλλά παρουσιάζει και εξωηπατικό πολλαπλασιασμό σε B και T λεμφοκύτταρα) όπου υποδοχείς του κυττάρου-ξενιστή αλληλεπιδρούν με επιφανειακές πρωτεΐνες του ιού, ακολουθεί η ενδοκυττάρωση και μέσα στον ξενιστή λαμβάνει χώρα η απελευθέρωση του γονιδιώματος του ιού.

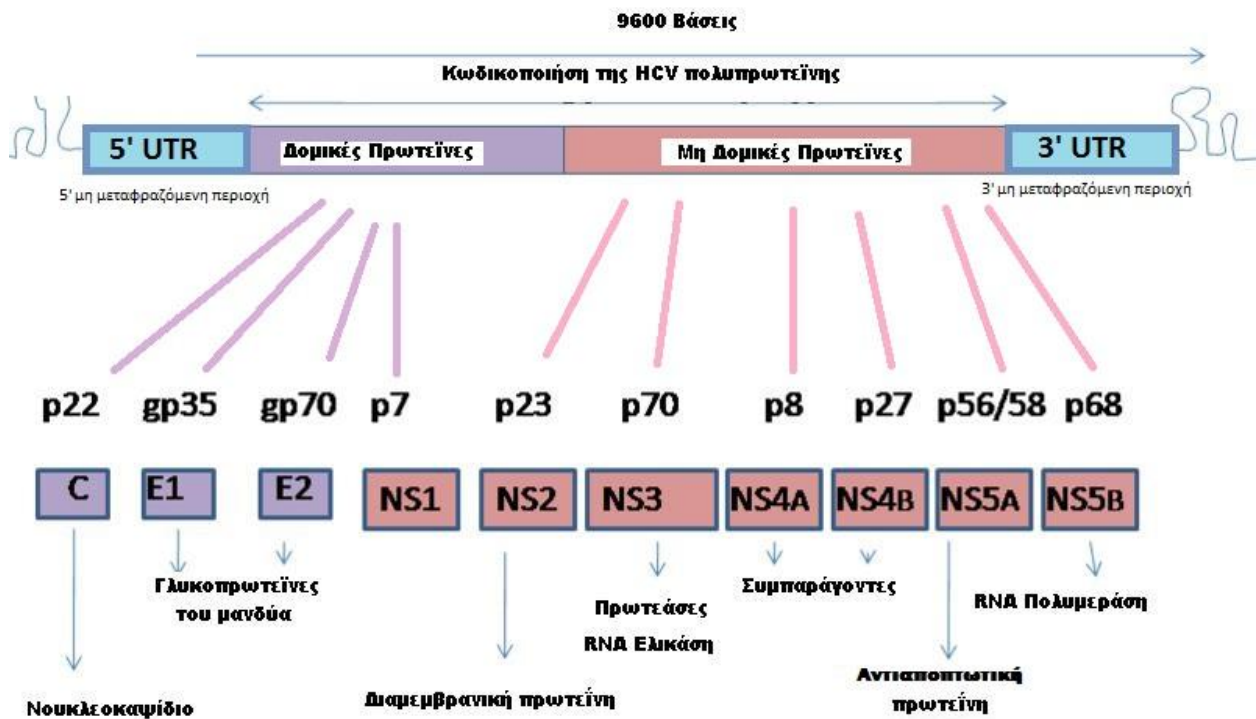


Εικόνα 2.1.1.: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του ιού μέσα στο κύτταρο-ξενιστή.

2.1.α. Κωδικοποιούσα περιοχή του ιού

Ο HCV ιός διαθέτει γονιδίωμα μήκους 9,6 κιλοβάσεων, από τη μετάφραση του οποίου προκύπτει μία αρχική πολυπρωτεΐνη 3010-3033 αμινοξέων. Η πολυπρωτεΐνη αυτή ωριμάζει μέσω της πρωτεολυτικής δράσης ειδικών πρωτεασών και καταλήγει σε δέκα επιμέρους πρωτεΐνες, οι οποίες κατά σειρά είναι οι εξής: C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B [7, 8].

Τα πολυπεπίδια που σχηματίζονται από την πρωτεόλυση του αμινο-τελικού άκρου της πολυπρωτεΐνης ονομάζονται **δομικές πρωτεΐνες** (C-E1-E2-P7), ενώ όλα τα υπόλοιπα πολυπεπίδια αποτελούν τις **μη δομικές πρωτεΐνες** του ιού (NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B), η έκφραση των οποίων οδηγεί στον σχηματισμό συμπλόκων αντιγραφής και συνεπώς κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος [9]. Στα άκρα του RNA του ιού εντοπίζονται επίσης δύο αρκετά διατηρημένες αλληλουχίες, γνωστές ως 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (UTR-untranslated region). Η 5' UTR λειτουργεί ως σημείο έναρξης της μετάφρασης της πολυπρωτεΐνης, ενώ η 3' UTR περιλαμβάνει στοιχεία απαραίτητα για τις διαδικασίες μετάφρασης και πολλαπλασιασμού του ιού [10, 11, 12].



Εικόνα 2.1.α.1.: Το HCV γονιδίωμα και οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από τη μετάφραση του.

2.1.β. Δομικές πρωτεΐνες του ιού

Η **CORE(C)** είναι πρωτεΐνη του καψιδίου η οποία αποτελείται από 191 αμινοξέα και πρόκειται για μία περιοχή πολύ καλά διατηρημένη μεταξύ των στελεχών του ιού [13, 14]. Συγκρατείται μέσω του υδρόφοβου καρβοξυτελικού της άκρου στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου του ξενιστή. Η CORE πρωτεΐνη έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται στην 60S ριβοσωμική υπομονάδα και ρυθμίζει πλήθος κυτταρικών **οδών μεταγωγής σήματος**, ενώ εμπλέκεται στις διαδικασίες απόπτωσης, καρκινογένεσης και μεταβολισμού των λιπιδίων [14, 15, 16].

Οι **E1 και E2** είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες του πρωτεϊνικού περιβλήματος του ιού. Η E2 είναι υπεύθυνη για τη σωστή αναδίπλωση και λειτουργικότητα της E1 και διαθέτει αντιαποπτωτική δράση [17, 18, 19]. Επιπλέον, φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητα διαφυγής του ιού από την ανοσολογική απάντηση του ασθενούς, λόγω του γεγονότος ότι διαθέτει μία περιοχή στο αμινοτελικό άκρο της που παρουσιάζει εξαιρετική ποικιλομορφία [20,21,22,23,24].

Η **P7** είναι μία μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη που λειτουργεί ως κανάλι ιόντων ο δε γενικότερος μοριακός μηχανισμός της δεν έχει ακόμα καθοριστεί.

2.1.γ. Μη δομικές πρωτεΐνες του ιού

Η πρωτεΐνη **NS1** είναι μία γλυκοπρωτεΐνη του περιβλήματος η οποία ως πλήρης μορφή βρέθηκε στις μεμβράνες μολυσμένων κυττάρων. Οι μεταλλάξεις HCV-NS1 έχουν δείξει ότι αναστέλλουν τη λοιμογόνο δράση, αλλά η βιολογική λειτουργία της HCV-NS1 είναι ακόμα ασαφής.

Η **NS2** είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη, η δράση της οποίας διευκολύνει τη μόλυνση του κυττάρου-ξενιστή από τον ιό [25]. Ειδικότερα, συνδέεται στον προαποπτωτικό παράγοντα CIDE_B και αναστέλλει τη δράση του. Επιπρόσθετα, ενώ δημιουργεί πρόδρομο σύμπλοκο με την NS3 και επιδρά στη μεταγραφή συγκεκριμένων κυτταρικών γονιδίων, δεν είναι καθοριστική για την αντιγραφή του ιού [26].

Η **NS3** αποτελεί μία υδρόφιλη πρωτεΐνη μεγάλου μεγέθους και πολλαπλών λειτουργιών, η οποία μεθυλιώνεται σε θέσεις αργινίνης [27]. Εντοπίζεται πλησίον του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου αλληλεπιδρά με την NS4A πρωτεΐνη, γεγονός που συμβάλει σημαντικά στη σταθερότητα της. Πιθανή είναι δε και η αντιαποπτωτική δράση της NS3, ενώ δεν αποκλείονται επίσης οι αλληλεπιδράσεις της τόσο με ιστόνες, όσο και με πρωτεΐνες μεταγωγής σημάτων [31, 32, 33]. Το αμινοτελικό άκρο της NS3 προσδίδει σε αυτήν ιδιότητες πρωτεάσης, ενώ στο καρβοξυτελικό της τμήμα οφείλονται οι δράσεις ελικάσης και νουκλεοσιδικής τριφωσφατάσης, ιδιότητες καθοριστικές για την αντιγραφή του ιικού RNA. [28, 29, 30]

Οι **NS4A** και **NS4B** πρωτεΐνες βρίσκονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αντιγραφής του HCV γονιδιώματος [34]. Ειδικότερα, η NS4A συμμετέχει ενεργά στην υπερφωσφορυλίωση της NS5A πρωτεΐνης [35], ενώ σύμφωνα με αποτελέσματα πρόσφατων μελετών, αμφότερες οι NS4A και NS4B φαίνεται ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδιώματος του ιού [36, 37].

Η **NS5A** αποτελείται από 3 δομικές περιοχές, η αλληλουχία της περιλαμβάνει 447 αμινοξέα και κατέχει ενεργό ρόλο στην αντιγραφή του ιού [41, 42]. Επιπλέον, Η NS5A αποτελεί την κύρια αντιαποπτωτική πρωτεΐνη του HCV και αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη NS5B

[43, 44]. Στην κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης εντοπίζονται στοιχεία που προσδίδουν τη ρυθμιστική της δράση στις διάφορες οδούς μεταγωγής σήματος, καθώς και στοιχεία υπεύθυνα για την αντιαποπτωτική της δράση. Η NS5A συνδέεται ποικιλοτρόπως με μεταγωγικές οδούς που επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την επιβίωση του μολυσμένου κυττάρου [79], ενώ παράλληλα φαίνεται να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για τη λειτουργία της ιντερφερόνης [45, 46].

Η **NS5B** πρωτεΐνη διακρίνεται από υψηλό βαθμό συντήρησης ανάμεσα στα διάφορα γένη της οικογένειας *Flaviviridae* και εντοπίζεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, όπως και οι προαναφερθείσες NS4A και NS4B πρωτεΐνες [38]. Επίσης, η αμινοξική της αλληλουχία περιλαμβάνει το μοτίβο Gly-Asp-Asp που αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των RNA-εξαρτώμενων RNA πολυμερασών [39]. Συνεπώς, η NS5B έχει τη δράση πολυμεράσης και επιτελεί την αντιγραφή του ιικού RNA αλλά και του ενδιάμεσου RNA κλώνου αρνητικής πολικότητας. Ωστόσο, η NS5B στερείται της δράσης εξωνουκλεάσης με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η διόρθωση των εκάστοτε λαθών που προκύπτουν κατά την αντιγραφή, γεγονός που συμβάλλει στην ποικιλομορφία του ιού [40].

2.2. Γενετική Ετερογένεια

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο HCV είναι ένας RNA ιός που χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό ετερογένειας, γεγονός που αποδίδεται στην έλλειψη εξωνουκλεοτιδικής δράσης της RNA πολυμεράσης του. Αυτό το χαρακτηριστικό της ιικής πολυμεράσης οδηγεί σε συχνή εμφάνιση σφαλμάτων (10^{-3} έως 10^{-4} αντικαταστάσεων/θέση/έτος) και κατ' επέκταση σε έναν ανομοιογενή πληθυσμό RNA γονιδιωμάτων *in vivo*. Οι περιοχές του γονιδιώματος που εμφανίζουν το μεγαλύτερο βαθμό ετερογένειας είναι εκείνες που μεταφράζονται στις πρωτεΐνες του ιικού περιβλήματος. Η αλληλουχία στο 5' άκρο του E2 γονιδίου χαρακτηρίζεται από τη μεγαλύτερη ετερογένεια και αποτελεί την πρώτη υπερμεταβλητή περιοχή (*HVR1*), ενώ λίγα είναι τα στελέχη που διαθέτουν μία δεύτερη υπερμεταβλητή περιοχή, όπως είναι η *HVR2*, η οποία βρίσκεται αποκλειστικά σε στελέχη του γονοτύπου 1b [47, 48, 49].

Ο ιός στους ασθενείς της ηπατίτιδας C εντοπίζεται ως ένα σύνολο γονιδιωμάτων που εμφανίζουν νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ τους σε ποσοστό 95-99%. Αυτά τα αρκετά όμοια

γονιδιώματα αναφέρονται ως quasispecies¹ [50] και έχουν προκύψει μέσα από μία εξελικτικά δυναμική γενετική διεργασία. Σε αυτή μάλιστα την ιδιομορφία του HCV φαίνεται να αποδίδεται το πλεονέκτημα επιβίωσης κατά την εξελικτική του πορεία. Πιο συγκεκριμένα, η συνύπαρξη παρόμοιων ιικών γονιδιωμάτων σε ένα ξενιστή, καθώς και η ικανότητα του ιού να δημιουργεί νέα γονιδιώματα οδηγεί όπως είναι αναμενόμενο στην φυσική επιλογή των μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων με τη μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα στις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών [51, 52, 53]. Επίσης, είναι πολύ πιθανό η παρουσία των quasispecies (ομάδα στελεχών του ιού) να αποτελεί συνέπεια ανοσολογικής πίεσης, αφού δεν παρατηρείται ανάπτυξη τους σε άτομα με υπογαμμασφαιριναιμία. Αυτή η γενετική ιδιαιτερότητα του ιού HCV έχει σαν αποτέλεσμα:

- την εμμένουσα χρόνια λοίμωξη
- τον διαχωρισμό διαφορετικών ή παρόμοιων γονιδιωμάτων ανάλογα με το είδος του κυττάρου ή ακόμη σε διαφορετικά κύτταρα του ίδιου ιστού
- τη δυσμενή πρόγνωση της νόσου
- την δυσκολία ανάπτυξης εμβολίου κατά του ιού
- την αντίσταση του ιού στην θεραπεία

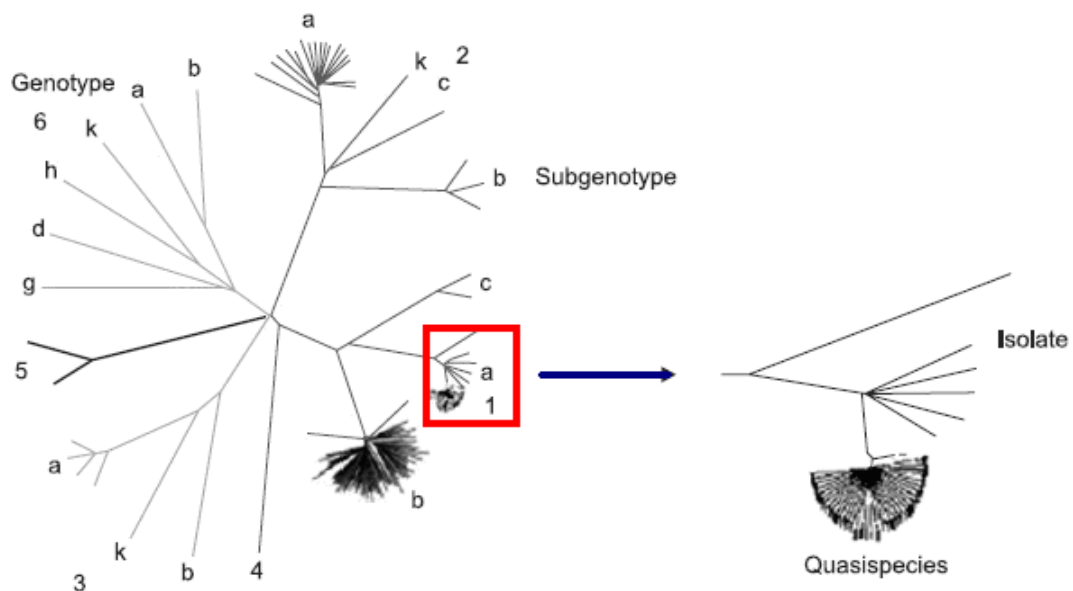
2.2.α. Γονότυποι και γεωγραφική κατανομή τους

Το σύνολο των μεταλλάξεων, η φυσική επιλογή των προσαρμοσμένων ιικών στελεχών και η διασπορά των γονιδιωμάτων τους, με την πάροδο του χρόνου, σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές και μέσω συγκεκριμένων πληθυσμιακών ομάδων, συνετέλεσαν στην προοδευτική διαφοροποίηση των γονοτύπων του HCV από το κοινό αρχέγονο στέλεχος του ιού, που ενδεχομένως είναι φυσική συνέπεια μιας κλασσικής εξελικτικής διαδικασίας. Η γενετική ετερογένεια του HCV είναι πολύπλοκη. Ο ιός έχει ταξινομηθεί σε 4 ιεραρχικά κατηγορίες:

¹ Η γενετική ποικιλομορφία του ιού στην υπερμεταβλητή (HVR1) περιοχή των γονιδίων των E1 και E2 μέσα στον ίδιο τον ασθενή ή ταυτόχρονη παρουσία διαφορετικών στελεχών του ιού, αλλά στενά συνδεδεμένων μεταξύ τους, γνωστών ως quasi-species, ίσως επιτρέπει στον ιό να παρακάμπτει την ισχυρή ανοσολογική απόκριση του οργανισμού και να οδηγεί σε χρόνια λοίμωξη (Λευκοθέα Χ. Παπαδοπούλου, «Σημειώσεις Εφαρμοσμένης Φαρμακολογίας και Θεραπευτικής», 2005). Η θεωρία των Quasispecies αρχικά διατυπώθηκε για να εξηγήσει την εξέλιξη της ζωής στον προκυτταρικό κόσμο του RNA (μακρομόρια). Πρόκειται για μια ομάδα στελεχών του ιού που εμπλέκονται σε γενετικές παραλλαγές/μεταλλάξεις κατά την εξέλιξη των ιικών γονιδιωμάτων. Η δυναμική αντιγραφής RNA και η δομή τους, τα καθιστά ικανά να επιτρέπουν τον ιογενή μηχανισμό σε κύτταρα ξενιστές, ώστε να προκαλούν νόσο.

γονότυπους (genotypes), υπότυπους-υπογονότυπους (subgenotypes), απομονωθέντα στελέχη (isolates) και ομάδες διαφορετικών στελεχών του ιού (quasispecies) [54]. Με εφαρμογή της μεθόδου της φυλογενετικής ανάλυσης οι γονότυποι, οι υπότυποι και τα στελέχη (isolates) του HCV, ταυτοποιούνται, ανάλογα με το ποσοστό διαφοροποίησης επί της συνολικής αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων τους.

Ο γονότυπος όλων των μεταδιδόμενων HCV στελεχών αποτελεί ενδογενές χαρακτηριστικό τους, το οποίο παραμένει αμετάβλητο από την αρχική εμφάνιση της λοίμωξης μέχρι και σήμερα. Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναγνωριστεί έξι HCV γονότυποι (1 έως 6) με περαιτέρω διακλαδώσεις σε επιμέρους υπότυπους, οι οποίοι ξεπερνούν τους 80 σε αριθμό και συμβολίζονται με την προσθήκη αλφαβητικών στοιχείων δίπλα από τον αριθμό του κύριου γονότυπου (1a, 1b, 1c κτλ.).



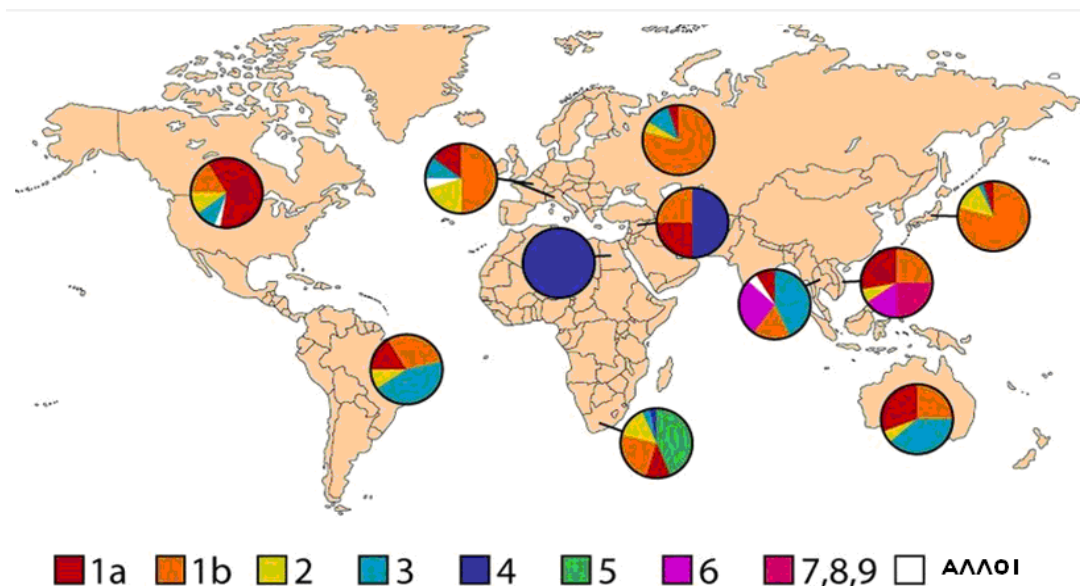
Εικόνα 2.2.α.1.: οι έξι κύριοι γονότυποι του HCV (1 έως 6) οι οποίοι διακλαδίζονται σε περισσότερους των 70 υποτύπων που αναγνωρίζονται από την προσθήκη μικρών στοιχείων της αλφαβήτου (1a, 1b, 1c κτλ.)

Αξιοσημείωτο δε είναι το γεγονός ότι ορισμένοι γονότυποι που αρχικά εντοπίζονταν σε απομονωμένες γεωγραφικά πληθυσμιακές ομάδες, στην πορεία διαδόθηκαν ευρέως, πιθανότατα λόγω πληθυσμιακών ανακατατάξεων και αναμειξέων σε συνδυασμό με την εμφάνιση νέων τρόπων μετάδοσης του ιού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η παγκόσμια εξάπλωση του γονότυπου 1b, η οποία είχε ως αφετηρία τη Δυτική ή Κεντρική Αφρική και πιθανώς οφείλεται σε

μεταγγίσεις αίματος, ενώ η διάδοση του γονότυπου 3a από την Ινδία ή τη Νότιο-Ανατολική Ασία προς την πλειοψηφία των βιομηχανοποιημένων χωρών οφείλεται σε επαφή των ατόμων με μολυσμένες βελόνες κατά τη χρήση ενδοφλέβιων τοξικών ουσιών [1].

Από επιδημιολογικές μελέτες προκύπτουν πληροφορίες σχετικά με τη γεωγραφική κατανομή των διαφορετικών γονοτύπων και των υποτύπων τους ανά τον κόσμο [55]. Οι πληροφορίες είναι σημαντικές, τόσο από επιδημιολογική άποψη, όσο και από κλινική για τη διαχείριση της νόσου (τρόποι μετάδοσης, θεραπεία, πρόγνωση, ανάπτυξη εμβολίων κλπ). Σύμφωνα λοιπόν με δημοσιευμένα στοιχεία ισχύουν τα ακόλουθα:

- ❖ Οι γονότυποι 1, 2 και 3 εμφανίζονται κυρίως στους χώρους της Δυτικής Ευρώπης και των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής με συχνότητες που ποικίλουν.
- ❖ Ο υπότυπος 1b εμφανίζεται συχνότερα στη Νοτιοανατολική Ασία.
- ❖ Ο γονότυπος 4 κυριαρχεί έναντι των υπολοίπων στη Μέση Ανατολή, τη Βόρεια και Κεντρική Αφρική, ενώ στη Νότια Αφρική επικρατεί ο γονότυπος 5.
- ❖ Ο γονότυπος 6 εντοπίζεται αποκλειστικά στην περιοχή της Νοτιοανατολικής Ασίας.



Εικόνα 2.2.α.2.: Παγκόσμια γεωγραφική κατανομή γονοτύπων ηπατίτιδας C.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον ελλαδικό χώρο σε ένα αρκετά αντιπροσωπευτικό δείγμα ασθενών με ηπατίτιδα C από το 1997 έως και το 2006, η κατανομή των γονοτύπων 1, 2, 3, και 4 ήταν αντίστοιχα 45,1%, 7%, 34% και 13,9%. Ο γονότυπος 1 ήταν ο επικρατέστερος στις γυναίκες που είχαν προσβληθεί νωρίτερα στη ζωή τους (55,9%) και στους ασθενείς μολυσμένοι

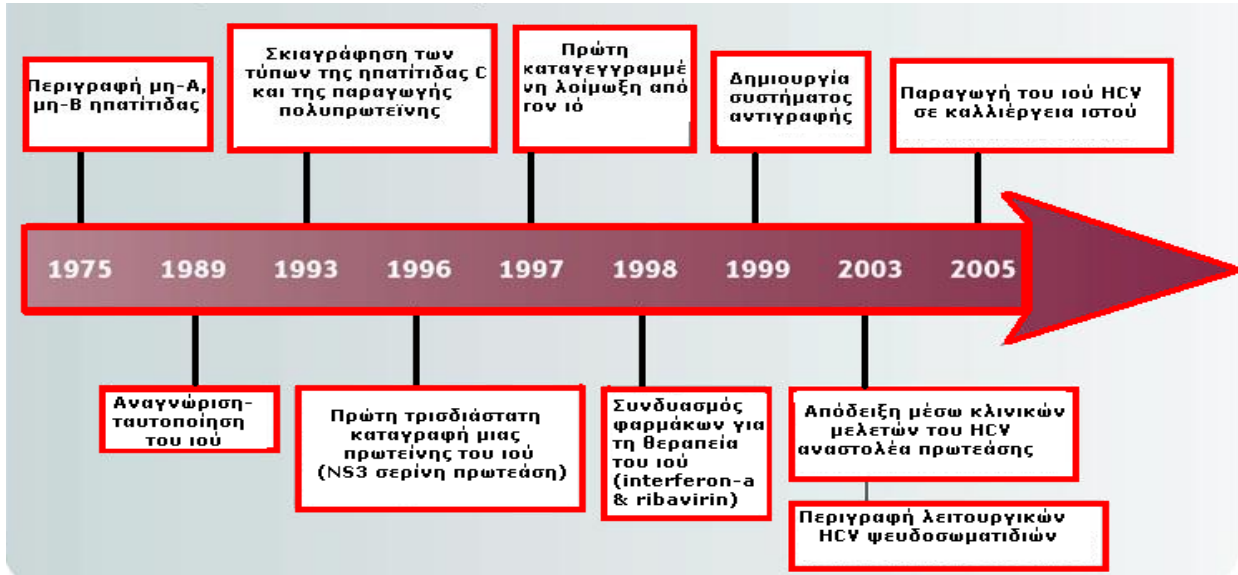
από μετάγγιση (61,6%). Ο γονότυπος 3 ήταν ο κυρίαρχος στους νεότερους ασθενείς (43%) και σε αυτούς από χρήση τοξικών ουσιών (63,3%). Σημαντική μείωση με την πάροδο των ετών παρατηρήθηκε στον γονότυπο 1 που σχετιζόταν με τη μετάδοση μέσω μετάγγισης, ενώ αύξηση παρατηρείται στον γονότυπο 3 που σχετίζεται με τους χρήστες ναρκωτικών ουσιών [64].

Στα ίδια συμπεράσματα καταλήγει ακόμη μία ελληνική μελέτη [95], στην οποία διαπιστώθηκε ότι σε ασθενείς με HCV, ο γονότυπος 3 ήταν ο επικρατέστερος, ενώ ακολουθούσαν οι γονότυποι 1 (34.1%), 2 (12.2%), 4 (10.9%), και 5 (1.2%). Ο γονότυπος 6 δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν ασθενή. Οι επικρατούσες υποκατηγορίες ήταν οι 3a (32.9%), 1b (26.8%), και 2a (6.1%), ενώ ο υπότυπος 3a φάνηκε να κυριαρχεί σε νεαρούς άνδρες.

Σε έλεγχο ανίχνευσης του γονοτύπου 5, ο οποίος πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια διαφορετικής μελέτης [94], ο γονότυπος 5a με 1.9% ήταν ο πέμπτος επικρατέστερος γονότυπος μετά από τους γονότυπους 1 (41.9%), 3 (32.7%), 4 (16.2%), και 2 (7.2%). Η πλειοψηφία των ασθενών που βρέθηκε ότι είχαν μολυνθεί με το γονότυπο 5 (84.2%) προέρχονταν από το Γενικό Νοσοκομείο της Ρόδου.

2.3. Επιδημιολογία

Η ηπατίτιδα C αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη νόσο στον παγκόσμιο πληθυσμό [56]. Το 1974 αναγνωρίστηκε πρώτη φορά ως ικός παράγοντας πρόκλησης ηπατίτιδας. Στην αρχή συσχετίστηκε αποκλειστικά με τη μετάγγιση αίματος και ονομάστηκε τύπου μη-A, μη-B ηπατίτιδα (*MAMBH*).



Εικόνα 2.3.1.: Χρονολογίες-σταθμοί στην ιστορία του ιού της ηπατίτιδας C.

Έως το 1989 επικρατούσε η υπόθεση πως ο HCV χαρακτηρίζεται από μία σχετικά απλή γενετική οργάνωση. Ωστόσο, τα επιδημιολογικά και νοσολογικά προβλήματα έχρηζαν πολύπλοκης αντιμετώπισης, καθώς η παρεντερική του μετάδοση προκαλεί τόσο οξεία λοίμωξη, όσο και χρόνια ηπατίτιδα [57, 58]. Η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας C θεωρείται ως μία ιϊκή πανδημία 5 φορές πιο εκτεταμένη από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (*HIV-Human Immunodeficiency Virus*) [59].

Σε περιοχές της Αφρικής και της Ασίας παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες συχνότητες εμφάνισης της νόσου στο γενικό πληθυσμό συγκριτικά με τη Βόρειο Αμερική και την Ευρώπη, γεγονός που καταδεικνύει μία ανοδική τάση των συχνοτήτων από το Βορρά προς το Νότο και από τη Δύση προς την Ανατολή [55, 58]. Στις Η.Π.Α. καταγράφονται 4.000.000 προσβληθέντες από τον ιό, στην Ιαπωνία οι ασθενείς υπολογίζονται σε 5.000.000, ενώ στην Ευρώπη ο αριθμός των οροθετικών κυμαίνεται από 2 έως 5 εκατομμύρια. Ο υψηλότερος

επιπολασμός παγκοσμίως αναφέρεται στην Αφρική και πιο συγκεκριμένα στην Αίγυπτο, όπου ανιχνεύονται αντισώματα για τον HCV σε ποσοστό 6-28% των εξεταζομένων ατόμων [61].

Οι φορείς της ηπατίτιδας C στην Βόρειο Ευρώπη έχουν ιστορικό μεταγίσεων σε ποσοστό 15%, ιστορικό χρήσης ναρκωτικών ουσιών σε ποσοστό 70%, ενώ το ποσοστό μόλυνσης των μακροχρόνιων σεξουαλικών συντρόφων εμφανίζεται χαμηλότερο από 5% [62].

Καταγραφές στην Ελλάδα αποδεικνύουν τον επιπολασμό της ηπατίτιδας C στον αιμοδοτικό πληθυσμό [87]. Στο πρώτο εξάμηνο του 1997 παρατηρήθηκε ότι στη συγκεκριμένη πληθυσμιακή ομάδα, το ποσοστό των αιμοδοτών που εμφάνιζαν στο αίμα τους αντισώματα της ηπατίτιδας C έφθασε το 0,14%. Μετά το 1990 [63] και λόγω της καθιέρωσης του υποχρεωτικού προληπτικού ελέγχου των αιμοδοτών για αντί-HCV με ευαίσθητες ορολογικές δοκιμασίες, ο κίνδυνος μόλυνσεως μέσω μετάγγισης μειώθηκε σημαντικά. Ωστόσο, υπάρχει ένας μικρός αριθμός φορέων που δίνει αρνητικό αποτέλεσμα στον αντί-HCV έλεγχο, ακόμα και με την εφαρμογή των πιο ευαίσθητων ορολογικών μεθόδων. Επίσης, η χορήγηση πλάσματος και άλλων παραγώγων αίματος ευθύνεται εξίσου για τη διασπορά του ιού. Τελευταία έρευνα του ΚΕΕΛΠΝΟ στη χώρα μας αποφάνθηκε ότι περίπου το 1,9% του γενικού πληθυσμού πάσχει από χρόνια λοίμωξη από τον ιό, ποσοστό μεγαλύτερο από το 0,14-0,83% που κατέχουν οι αιμοδότες. Αυτή η ελάττωση του επιπολασμού της νόσου από μεταγίσεις οδηγεί στη μείωση του ποσοστού επιπολασμού του γονότυπου 1 και στην αύξηση του ποσοστού εμφάνισης του γονότυπου 3 [64].

Η μόλυνση από μετάγγιση αίματος και μεταμόσχευση οργάνων έχει θεαματικά ελαττωθεί με τις νέες ευαίσθητες μεθόδους ανίχνευσης που εφαρμόζονται μετά το 1992 [75, 76].

Ωστόσο, το πρόβλημα που κυριαρχεί σήμερα δεν εντοπίζεται στον πληθυσμό των αιμοδοτών, αλλά ως επί το πλείστο στις κλειστές πληθυσμιακές ομάδες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα κλειστής κοινότητας αποτελούν οι χρήστες ενδοφλέβιων τοξικών ουσιών, οι οποίοι εμφανίζουν πολύ υψηλό ποσοστό επιπολασμού (70-90%) παγκοσμίως [55, 65].

Πληθυσμιακή ομάδα με υψηλό επιπολασμό αποτελούν και οι αιμοκαθαιρόμενοι με επίπεδα περίπου 20% σε παγκόσμια κλίμακα, αλλά με μεγάλη διακύμανση [68, 86]. Περιοχές, όπως Taiwan, Ιαπωνία, Σαουδική Αραβία κ.λ.π., εμφανίζουν επιπολασμό που κυμαίνεται από 30%-40% και σε περιοχές, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ν. Ζηλανδία και η Ν. Αφρική, ο επιπολασμός φθάνει περίπου το 5% [55].

Εξίσου σημαντικό πρόβλημα εμφανίζεται ενδοοικοκομειακά [70], αφού σύμφωνα με αποτελέσματα ποικίλων μελετών το ποσοστό επιπολασμού στους νοσοκομειακούς ασθενείς κυμαίνεται από 2 έως 20%. Το προσωπικό των νοσοκομείων αποτελεί επίσης ομάδα υψηλού κινδύνου για μόλυνση από τον ιό, κυρίως λόγω της συχνής επαφής των εργαζομένων με βελόνες [71, 72]. Πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη στην Ιαπωνία δείχνει ότι το 10% των ατόμων που τραυματίζονται τυχαία από μολυσμένη βελόνα έχουν αυξημένες πιθανότητες να μεταπέσουν σε φορείς της ηπατίτιδας C, αντικρούοντας έτσι τα αποτελέσματα αντίστοιχης παλαιότερης μελέτης [73]. Αξίζει να σημειωθεί πως η ενδεχόμενη μόλυνση με HCV από αμελή χρήση συρίγγων και βελονών αναφέρεται και σε πρόσφατη Ελληνική μελέτη [81].

Αρκετές είναι και οι μελέτες που εξετάζουν την ενδοοικογενειακή μετάδοση του ιού, με χαρακτηριστική αυτή της Γερμανίας, σύμφωνα με την οποία κανένας από τους εξεταζόμενους συζύγους ατόμων με ηπατίτιδα C δεν μολύνθηκε από τον ιό [59, 67]. Αντιθέτως, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές έδειξαν μόλυνση των συζύγων ασθενών σε ποσοστό 8,8%, γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία του γεωγραφικού παράγοντα στη μετάδοση της νόσου. Στην Ασία το ποσοστό μετάδοσης του ιού στους συζύγους αγγίζει το 25%, ενώ σε Ευρώπη, Αμερική και Αυστραλία φθάνει μόλις το 5%. Όσον αφορά τα υπόλοιπα μέλη των οικογενειών που κατοικούν στο ίδιο σπίτι τα ποσοστά μετάδοσης που παρατηρούνται είναι αρκετά χαμηλά [74, 75].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσφατης γαλλικής μελέτης, το φάσμα των ηλικιών που προσβάλλονται από τον ιό διευρύνεται από την ηλικία των 20 έως την ηλικία των 60 ετών, ενώ υψηλότερος επιπολασμός παρατηρείται μεταξύ των ανδρών σε σχέση με τις γυναίκες [75].

Ωστόσο, στην Ευρώπη και ιδιαίτερα στην Ελλάδα δεν υπάρχουν πρόσφατες και εκτενείς επιδημιολογικές μελέτες συσχετιζόμενες με την παρουσία του ιού της ηπατίτιδας C στο σύνολο του πληθυσμού ή σε ειδικές ομάδες.

Συνοπτικά οι τρόποι μετάδοσης- διασποράς του ιού HCV είναι οι κάτωθι:

- ▶ Χρήση ενδοφλεβίων ναρκωτικών
- ▶ Μετάγγιση αίματος ή παραγώγων του (ειδικά πριν το 1992)
- ▶ Νοσοκομειακή μετάδοση (*Αιμοκάθαρση, Ιατρικές ή παραϊατρικές πράξεις κ.α*)
- ▶ Επαγγελματική έκθεση
- ▶ Μεταμόσχευση
- ▶ Γενετήσια (*σεξουαλική*) μετάδοση
- ▶ Ενδοοικογενειακή μετάδοση
- ▶ Κάθετη μετάδοση (*από μητέρα σε παιδί*) και οριζόντια μετάδοση.

2.4. Φυσική ιστορία

Με την είσοδο του ιού της ηπατίτιδας C στον οργανισμό ενεργοποιείται η κυτταρική ανοσοαπόκριση, η οποία οδηγεί τελικά στη λύση των μολυσμένων ηπατοκυττάρων, ενώ τα αντισώματα που σχηματίζονται έναντι του HCV δεν επαρκούν για την εξουδετέρωση της δράσης του. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ο HCV προκαλεί μακροχρόνια λοίμωξη, γεγονός που οφείλεται κυρίως σε ικούς παράγοντες, αλλά και στο αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα του προσβληθέντος. Επίσης, η λοίμωξη από ηπατίτιδα C προκαλεί βραχεία ανοσία, αφού αρκετά συχνά παρατηρείται επαναμόλυνση του ατόμου από ένα ομόλογο ή μη, ικό στέλεχος.

Αυτή η μακροχρόνια παραμονή τη λοίμωξης και η απουσία ανοσίας σε επόμενη μόλυνση του ατόμου από τον ιό πιθανότατα αποδίδονται στην μη εξουδετερωτική δράση των αντισωμάτων και στους μηχανισμούς της κυτταρικής ανοσοαπόκρισης. Η ποικιλομορφία του ιού και κατ' επέκταση οι διαφορές στις αντιγονικές ιδιότητες των πρωτεϊνών του αποτελούν χαρακτηριστικά που μπορούν κάλλιστα να συντηρούν τη λοίμωξη για μεγάλο χρονικό διάστημα, καθώς προκαλούν αλλαγές στο φαινότυπο χάρη στις οποίες ο ιός προσπερνά τις αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, η αντίσταση του ιού στους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού ίσως οφείλεται στη μετακίνηση της δράσης της κυτταρικής απόκρισης από ισχυρούς αντιγονικούς επίτοπους σε πιο ασθενείς, με αποτέλεσμα τη μη ολοκληρωμένη εξουδετέρωση των μολυσμένων ηπατοκυττάρων.

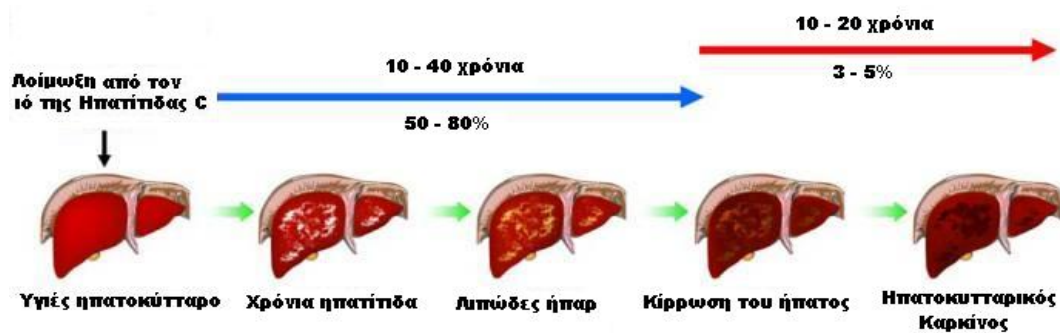
Η παθογένεια της ηπατίτιδας C δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως, ωστόσο κατά πάσα πιθανότητα αποδίδεται στην ευαισθητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια

στα ιικά αντιγόνα που εκφράζονται στην πρωτοπλασματική μεμβράνη, μηχανισμός που παρατηρείται και στην παθογένεια της λοίμωξης που προκύπτει από τον ιό της ηπατίτιδας Β. Τα CD4+ και CD8+ λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στο αίμα αλλά και στο ηπατικό παρέγχυμα αντιδρούν με τα αντιγόνα του ιού, τα οποία προέρχονται από τη δομική και μη-δομική περιοχή του ιικού γονιδιώματος. Εκτός των άλλων, ο ιός μολύνει και τα λεμφοκύτταρα ελαττώνοντας έτσι ακόμη περισσότερο την αποτελεσματική δράση της κυτταρικής ανοσοαπόκρισης.

Ο HCV προκαλεί οξεία ηπατίτιδα, η οποία κατά ένα μεγάλο ποσοστό είναι υποκλινική (75%), ενώ στο 80-90% των περιπτώσεων μεταπίπτει σε χρόνια λοίμωξη. Η χρόνια ηπατίτιδα C εμφανίζεται με ήπια μορφή τα πρώτα 10-20 χρόνια, αλλά αργότερα (20-30 χρόνια) παρουσιάζεται ίνωση ή/και κίρρωση του ήπατος σε ποσοστό περιπτώσεων που φθάνει το 20-30%. Το 1-3% των ασθενών με κίρρωση αναπτύσσει καρκίνο του ήπατος ετησίως. Αν και οι παράγοντες που επιδρούν στην εξέλιξη της χρόνιας HCV λοίμωξης δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως, φαίνεται ότι ο τρόπος μετάδοσης, η ηλικία, η διάρκεια της λοίμωξης, ο γονότυπος, το ιικό φορτίο, οι μεταλλαγές, η ανοσοαπόκριση, η εκτεταμένη χρήση αιθυλικής αλκοόλης και η παρουσία παρακείμενων λοιμώξεων αποτελούν ενοχοποιητικούς συντελεστές. Οι ασθενείς με παλαιότερες λοιμώξεις, οι ανοσοκατασταλαμένοι και τα άτομα που έχουν προσβληθεί από γονότυπο 1β κινδυνεύουν να εμφανίσουν κίρρωση του ήπατος πολύ περισσότερο από άλλες κατηγορίες ασθενών.

Συγκεκριμένοι απλότυποι του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας κλάσης II έχουν επίσης συνδεθεί είτε θετικά, είτε αρνητικά με την εξέλιξη της χρόνιας HCV ηπατίτιδας σε κίρρωση του ήπατος ή/και ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Γενικά, οι γνώσεις σχετικά με την πορεία της χρόνιας λοίμωξης έχουν εμπλουτισθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια, γεγονός που οφείλεται σε σημαντικές παρατηρήσεις. Πιο αναλυτικά, έχει διαπιστωθεί ότι στον HCV αποδίδεται το 90% των κρουσμάτων ηπατίτιδας μη-A, μη-B που προκαλούνταν από μεταγγίσεις αίματος μέχρι και τα τέλη της δεκαετίας του '80, όπου ξεκίνησε η εφαρμογή του ορολογικού ελέγχου των αιμοδοτών για αντισώματα HCV. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η πορεία της λοίμωξης από σποραδική ηπατίτιδα C (*community acquired*) είναι από κλινικής απόψεως, ανάλογη αυτής που εμφανίζεται σε άτομα που εκτίθενται παρεντερικά από τον ιό. Τέλος, η μακροχρόνια παρακολούθηση της εξέλιξης της HCV λοίμωξης σε άτομα που εμφάνισαν τη νόσο ύστερα από μετάγγιση έχει συμβάλει εξίσου στην πληρέστερη κατανόηση της φυσικής ιστορίας της χρόνιας ηπατίτιδας C. Από τα παραπάνω στοιχεία προκύπτει ότι η οξεία HCV λοίμωξη χαρακτηρίζεται

από ήπια εξέλιξη και σπανίως οδηγεί σε κεραινοβόλο ηπατική ανεπάρκεια. Η μετάπτωση της λοίμωξης σε χρόνια αγγίζει το 70-90% των περιπτώσεων, ενώ υπεύθυνη για αυτό το αξιοσημείωτο ποσοστό φαίνεται πως είναι η υψηλή μεταλλακτικότητα που εμφανίζει ο HCV σε συνθήκες ανοσολογικής πίεσης. Εξαιτίας αυτής της μεταλλακτικότητας ο ιός επιβιώνει τελικά ως ένα σύνολο μεταλλαγμένων μορφών με διαφορετικές αντιγονικές ιδιότητες, γνωστών με την ονομασία quasispecies. Περίπου το 27% των ατόμων που πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C εμφανίζουν κίρρωση στο ήπαρ μετά τα 20 έτη από την αρχική τους έκθεση στον ιό [100]. Ωστόσο, φαινόμενα όπως η νοσηρότητα από τη χρόνια ηπατίτιδα C και η θνησιμότητα από ηπατική ανεπάρκεια δεν είναι πολύ συχνά κατά την πρώτη 20ετία, ακόμη και στους ασθενείς που αναπτύσσουν κίρρωση του ήπατος. Το 25% των ασθενών με HCV λοίμωξη αναπτύσσουν ηπατοκυτταρικό καρκίνο (ΗΚΚ) 30 έτη μετά από την αρχική έκθεση τους στον ιό [100], ενώ ο ΗΚΚ παρουσιάζεται σε ασθενείς με HCV κίρρωση σε ποσοστό που φθάνει περίπου το 3% ανά έτος. Δυστυχώς, παρόλη την αξιοσημείωτη επιστημονική πρόοδο αναφορικά με την αντιμετώπιση της HCV ηπατίτιδας, τα περιστατικά της κίρρωσης και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (ΗΚΚ) φαίνεται να παρουσιάζουν αυξητική τάση [78, 89, 101].



Εικόνα 2.4.1.: Στάδια πιθανής εξέλιξης της νόσου από τον ιό της Ηπατίτιδας C

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, δύο από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της HCV λοιμώξεως είναι η μακροχρόνια παραμονή της και η πρόκληση χρόνιας ηπατίτιδας στις περισσότερες των περιπτώσεων. Παρόλα αυτά, οι γνώσεις μας για τη φυσική ιστορία της χρόνιας ηπατίτιδας C εξακολουθεί να εμφανίζει κενά, καθώς συνδέεται με ποικιλία ιστολογικών αλλοιώσεων του ήπατος, τόσο στους ασυμπτωματικούς φορείς απουσία ηπατικής βλάβης, όσο και στους ασθενείς με κίρρωση ή/και ηπατοκυτταρικό καρκίνο (ΗΚΚ) [85]. Οι περισσότερες από τις υπάρχουσες μελέτες αφορούν τη φυσική ιστορία της ηπατίτιδας C κατόπιν μετάγγισης αίματος, πολύ

λιγότερες είναι οι αναφορές για σποραδική λοίμωξη, ενώ ελάχιστα είναι τα στοιχεία που συνδέουν τη φυσική ιστορία της νόσου με ειδικές κατηγορίες ασθενών, όπως είναι οι ανοσοκατασταλμένοι (π.χ άτομα που έχουν προσβληθεί από τον ιό της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας, μεταμοσχευμένοι ασθενείς, άτομα που λαμβάνουν αγωγή με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα κλπ) ή τα άτομα με συνοδό πάθηση (πχ συλλοιμώξεις με άλλους ιούς ηπατίτιδας ή άλλες παρακείμενες λοιμώξεις). Το κυριότερο μειονέκτημα όλων των μελετών έγκειται στη σχετικά σύντομη παρακολούθηση των ασθενών, καθώς οι σοβαρές ηπατικές βλάβες εκδηλώνονται μετά από αρκετά χρόνια.

Οξεία HCV λοίμωξη

Η οξεία ηπατίτιδα C προσβάλλει άτομα ανεξαρτήτως φύλου ή ηλικίας και εμφανίζει αρκετά όμοια κλινική εικόνα και βιοχημικές διαταραχές με τις υπόλοιπες ιογενείς ηπατίτιδες. Ο χρόνος επώασης της νόσου από την αρχική έκθεση μέχρι την εμφάνιση βιοχημικών εργαστηριακών δεικτών κυμαίνεται από 2 έως 26 εβδομάδες και συχνότερα από 6 έως 12 εβδομάδες. Να σημειωθεί ότι με την εφαρμογή των σύγχρονων ορολογικών τεχνικών, η ανίχνευση της ορομετατροπής μειώνεται στις δύο εβδομάδες περίπου, ενώ το RNA του ιού εντοπίζεται στον ορό του αίματος μετά το πέρας της πρώτης εβδομάδας.

Η πορεία της κλασικής εξέλιξης της οξείας ηπατίτιδας C είναι γνωστή έπειτα από μετάγγιση αίματος ή των παραγώγων του, καθώς σε τέτοιες περιπτώσεις η χρονική στιγμή της έκθεσης του ατόμου στο λοιμογόνο παράγοντα είναι προφανής. Η έκφραση της οξείας ηπατίτιδας C ποικίλλει από ασυμπτωματική και ανικτερική έως ικτερική ή κεραυνοβόλος. Πιο συγκεκριμένα, στο 75% των προσβληθέντων, η νόσος εξελίσσεται ανικτερικά και ασυμπτωματικά με αποτέλεσμα η διάγνωση να μην είναι εφικτή, ενώ μόλις στο 25% των ασθενών παρατηρείται κλασική κλινική εικόνα οξείας ικτερικής ηπατίτιδας. Η σποραδική οξεία ηπατίτιδα C χαρακτηρίζεται από δυσμενέστερη κλινική πορεία, γεγονός που πιθανότατα αποδίδεται στη νοσηλεία αποκλειστικά και μόνο των σοβαρών περιπτώσεων, αφού οι ανικτερικές μορφές της λοίμωξης στερούνται διάγνωσης.

Η μετάπτωση της ηπατίτιδας σε χρόνια λοίμωξη παρατηρείται στους 6 ή 12 μήνες μετά την έναρξη της νόσου. Τα αντισώματα έναντι του HCV διατηρούνται στα άτομα που μεταπίπτουν σε χρόνια λοίμωξη, ενώ εξαφανίζονται σταδιακά από τα άτομα που τελικά θεραπεύονται μετά το

πέρας κάποιων ετών. Συνεπώς, ο ακριβής αριθμός των ασθενών που μεταπίπτουν σε χρονιότητα πιθανώς υποεκτιμάται. Έπειτα από παρακολούθηση του RNA του ιού προκύπτει ότι το 82-100% των περιπτώσεων μεταπίπτουν σε χρονιότητα, ενώ αντίστοιχα το ποσοστό μετάπτωσης της οξείας ηπατίτιδας Β σε χρόνια λοίμωξη, σε ενήλικες ασθενείς είναι αρκετά μικρότερο και φθάνει το 5-10%. Αρχικά επικρατούσε η εντύπωση ότι η σποραδική ηπατίτιδα C μεταπίπτει σε χρονιότητα με συχνότητα πολύ μικρότερη (10%) από την αντίστοιχη συχνότητα μετάπτωσης της οξείας ηπατίτιδας C έπειτα από μετάγγιση (40%-60%). Ωστόσο, η άποψη αυτή έχει πλέον αναθεωρηθεί.

Εκδήλωση κεραυνοβόλου ηπατίτιδας C παρουσιάζεται σε ποσοστό μικρότερο του 1% των ατόμων με οξεία ικτερική ηπατίτιδα και αποτελεί περίπου το $\frac{1}{3}$ των περιπτώσεων κεραυνοβόλου ιογενούς ηπατίτιδας. Αντιθέτως, η μετατροπή τη οξείας ηπατίτιδας ύστερα από μετάγγιση αίματος σε κεραυνοβόλο ηπατίτιδα είναι αρκετά σπάνια.

Χρόνια HCV λοίμωξη

Η μετάπτωση της οξείας ηπατίτιδας C σε χρόνια λοίμωξη είναι ως επί το πλείστον ασυμπτωματική και η διάγνωση της συνήθως είναι τυχαία σε ελέγχους αιμοδοσίας και σε προληπτικούς εργαστηριακούς ελέγχους.

Οι ασθενείς που πάσχουν από χρόνια λοίμωξη ηπατίτιδας C συχνά εμφανίζουν ιστολογικές αλλοιώσεις και ίνωση, η βαρύτητα των οποίων ποικίλει (χρόνια επιμένουσα ή χρόνια ενεργό ηπατίτιδα ή κίρρωση). Επιπλέον χαρακτηριστικά αυτών των ασθενών είναι η μετάπτωση τους από μία συγκεκριμένη ιστολογική εικόνα σε άλλη (αυτόματα ή μέσω θεραπείας) και η παρουσία εξωηπατικών εκδηλώσεων. Αξίζει να αναφερθεί ότι ένα μικρό ποσοστό των ατόμων με χρόνια λοίμωξη C δεν εμφανίζει τις κλασικές ιστολογικές αλλοιώσεις της χρόνιας ηπατίτιδας, εξού και τα άτομα αυτά ονομάζονται ασυμπτωματικοί «φορείς» του ιού. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η παρουσία και ο πολλαπλασιασμός του HCV δεν ταυτίζονται υποχρεωτικά με την ύπαρξη ηπατικής νόσου. Αυτό συμβαίνει διότι, αφενός δεν είναι γνωστό αν οι «φορείς» του ιού παραμένουν σταθεροί σε βάθος χρόνου και αφετέρου, οροθετικά, κλινικώς υγιή άτομα μπορεί κάλλιστα να υποκρύπτουν ιστολογικές αλλοιώσεις χρόνιας ηπατίτιδας ή ακόμη και κίρρωσης.

Έχει διαπιστωθεί ότι μόνο στο 2-5% των μακροχρόνια ασθενών παρατηρείται αυτόματη ύφεση της χρόνιας ηπατίτιδας C, με ακόλουθη εξαφάνιση του RNA του ιού από τον οργανισμό τους, σε αντίθεση με το αντίστοιχο ποσοστό της χρόνιας ηπατίτιδας B, το οποίο ανέρχεται περίπου στο 40%. Παράγοντες που επιδρούν στην ταχύτητα μετάπτωσης της χρόνιας ηπατίτιδας C σε κίρρωση του ήπατος είναι η ηλικία του ατόμου, ο τρόπος μετάδοσης, η χρονική διάρκεια της ασθένειας, η πιθανή μεταμόσχευση, η ωριμότητα και η επάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος, ο βαθμός της ιστολογικής βλάβης όπως αυτός παρατηρείται στην αρχική βιοψία, η αλόγιστη χρήση αιθυλικής αλκοόλης και η συνύπαρξη του HCV με τους HBV και HIV. Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η κλινική έκφραση της νόσου αντικατοπτρίζει την ισορροπία μεταξύ των επιπέδων ιαιμίας, των γονοτύπων του ιού και της κυτταρικής ανοσοαπόκρισης κατά των μολυσμένων ηπατοκυττάρων. Οι άτυπες υποκατηγορίες ασθενών που προαναφέρθηκαν, λόγω των ειδικών χαρακτηριστικών τους, διαφοροποιούνται στη φυσική ιστορία της λοίμωξης.

3. ΣΥΛΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επιδρά στην εξέλιξη της νόσου είναι οι πιθανές συλλοιμώξεις. Το φάσμα τους είναι αρκετά ευρύ και περιλαμβάνει όλα τα είδη λοιμώξεων που μπορούν να εκδηλωθούν, καθώς και λοιμώξεις που οφείλονται σε ηπατοτρόπους ιούς (*ιοί ηπατίτιδας A, B, C, D, E, G, μη A-G*).

Οι συνυπάρχουσες λοιμώξεις προερχόμενες από μικρόβια, παράσιτα, ρικέτσια ή μη ιούς ηπατίτιδας (*π.χ HIV, ερπητοϊοί, CMV, EBV, VZV, ιλαράς, ερυθράς, Coxsackie, κίτρινου πυρετού κ.λ.π.*) δε φαίνεται να επηρεάζουν ιδιαίτερα την πορεία της HCV λοίμωξης σε ασθενείς με αντιροπούμενη ηπατική λειτουργία και ικανοποιητικό ανοσοποιητικό σύστημα. Οι δε ανοσκοκατασταλμένοι ασθενείς φαίνεται να επιβαρύνονται σημαντικά από άλλου είδους λοιμώξεις, όπως για παράδειγμα οι μυκητιασικές.

Παρακάτω αναλύονται οι αλληλεπιδράσεις της HCV λοίμωξης, με λοιμώξεις που οφείλονται τόσο σε ιούς της ηπατίτιδας, όσο και σε άλλους ιούς (*π.χ. στον HIV*). Αυτοί οι ιοί συνυπάρχουν αρκετά συχνά με HCV λοιμώξεις επηρεάζοντας σημαντικά την επιδημιολογία και φυσική ιστορία της νόσου προκαλώντας παράλληλα έντονο προβληματισμό σχετικά με την εξέλιξη και την αντιμετώπιση τους.

3.1. Συλλοίμωξη με ηπατοτρόπους ιούς

► *Ιός ηπατίτιδας B*

Ο παρεντερικός μηχανισμός μετάδοσης του HCV είναι κοινός με τον αντίστοιχο μηχανισμό του HBV, γεγονός που οδηγεί σε συχνές συλλοιμώξεις. Η ικανότητα του HCV να καταστέλλει τη διαδικασία πολλαπλασιασμού του HBV αποτελεί την κύρια αιτία ηπατοπάθειας στην πλειοψηφία των ασθενών με συνυπάρχουσες λοιμώξεις HBV και HCV. Επίσης, σε ασθενείς με χρόνιες λοιμώξεις HCV και HBV, τα επίπεδα του HCV RNA παρατηρούνται χαμηλότερα από τα επίπεδα που εμφανίζονται συνήθως σε περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας C, με αποτέλεσμα η ανταπόκριση των συγκεκριμένων ασθενών στη θεραπεία να είναι περιορισμένη.

Σε χώρες της Ν. Ευρώπης (Β. Ιταλία – Ισπανία), ο HCV φάνηκε να επηρεάζει τη φυσική ιστορία της χρόνιας HBV ηπατοπάθειας, λόγω των κοινών τρόπων μετάδοσης και των δύο ιών (*ενδοφλέβια χρήση τοξικών ουσιών*). Η ηπατική νόσος στην ομάδα των "υγιών" φορέων συνήθως αποδίδεται σε επιλοίμωξη ή συλλοιμώξη με τον HCV. Στην Ελλάδα παρατηρήθηκε ότι το 1/3 των ασθενών με ΗΚΚ παρουσίασε χρόνια HCV λοίμωξη, ενώ σε περιστατικά συνέργειας και των δύο ιών ο κίνδυνος ανάπτυξης ΗΚΚ διαπιστώθηκε 4 φορές μεγαλύτερος.

► *Ιός ηπατίτιδας A*

Η συνύπαρξη χρόνιας HCV λοίμωξης με λοίμωξη που οφείλεται στον ιό ηπατίτιδας A συχνά οδηγεί στην εκδήλωση κεραινοβόλου ηπατίτιδας, γι αυτό και συνίσταται προφυλακτικός εμβολιασμός έναντι της ηπατίτιδας A των ατόμων που πάσχουν από χρόνια HCV λοίμωξη.

► *Ιός ηπατίτιδας D*

Η HDV λοίμωξη εμφανίζεται αποκλειστικά με ταυτόχρονη παρουσία HBV λοίμωξης στον οργανισμό, γεγονός που συνεπάγεται ότι η συνύπαρξη HDV λοίμωξης και ηπατίτιδας C συνεπάγεται τριπλή HBV, HDV, HCV λοίμωξη. Στις λοιμώξεις αυτές είναι επηρεπή άτομα ομάδων συμπεριφοράς υψηλού κινδύνου (*χρήστες ναρκωτικών ουσιών*) που εκτίθενται επανειλημμένα σε ποικίλους παρεντερικά μεταδιδόμενους παράγοντες.

Οι πιθανές συλλοιμώξεις είναι οι εξής:

- › οξεία HBV - HDV - HCV συλλοιμώξη,
- › οξεία HBV - HDV επιλοιμώξη σε προϋπάρχουσα χρόνια HCV λοίμωξη,
- › οξεία HCV επιλοιμώξη σε προϋπάρχουσα χρόνια HBV - HDV λοίμωξη,
- › οξεία HCV - HDV επιλοιμώξη σε προϋπάρχουσα χρόνια HBV λοίμωξη
- › οξεία HDV επιλοιμώξη σε προϋπάρχουσα χρόνια διπλή HBV- HCV λοίμωξη.

Η οξεία HCV - HDV επιλοιμώξη παρουσία χρόνιας HbsAg-αιμίας προκαλεί κεραινοβόλο ηπατίτιδα σε συχνότητα μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της απλής HDV επιλοιμώξης.

Υπάρχουν περιπτώσεις που οι τριπλές λοιμώξεις συμπεριφέρονται όπως οι διπλές HBV- HDV λοιμώξεις και εμφανίζουν δυσμενέστερη εξέλιξη από αυτήν των διπλών HBV- HCV λοιμώξεων, καταλήγοντας όπως είναι αναμενόμενο σε κίρρωση του ήπατος αρκετά σύντομα. Ωστόσο, δεν είναι λίγες και οι περιπτώσεις που οι τριπλές λοιμώξεις καταλήγουν σε κάθαρση του HBsAg με συχνότητα παρόμοια με εκείνη των διπλών HBV- HCV λοιμώξεων, σε αντίθεση με τις διπλές HBV - HDV λοιμώξεις, που όπως έχει παρατηρηθεί πολύ σπάνια οδηγούν σε κάθαρση του HbsAg. Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι στις τριπλές λοιμώξεις άλλοτε επικρατεί ο HCV, και άλλοτε ο HDV, ενώ έχουν περιγραφεί και περιπτώσεις όπου οι δύο αυτοί ιοί επικρατούν εναλλάξ στον ίδιο ασθενή.

► *Ιός ηπατίτιδας C*

Η παρουσία των HCV αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς δεν λειτουργεί προφυλακτικά, δηλαδή δεν επαρκεί για να τον προστατεύσει από πιθανή νέα λοίμωξη προερχόμενη από άλλο ή ακόμη κι απ' το ίδιο ιικό στέλεχος. Συνεπώς, τα άτομα που υφίστανται μακροχρόνια έκθεση στον ιό της ηπατίτιδας C διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο επιμόλυνσης από οποιοδήποτε HCV στέλεχος. Όπως είναι λοιπόν εμφανές, οι ασθενείς που πάσχουν από HCV λοίμωξη είναι αρκετά ευάλωτοι ως προς τις επαναλοιμώξεις εφόσον στερούνται αυτόματης προστασίας από τον ίδιο τον HCV με αποτέλεσμα να επιβαρύνεται η φυσική πορεία της λοίμωξης.

3.2. Συλλοιμώξη με ιούς μη ηπατίτιδας

► *Ιός HIV*

Οι ιοί της Ηπατίτιδας C και της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) χαρακτηρίζονται από κοινούς τρόπους μετάδοσης – μεταξύ των οποίων είναι και αυτός μέσω της παρεντερικής οδού, με αποτέλεσμα τα άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως είναι οι πολυμεταγγιζόμενοι και οι χρήστες ενδοφλέβιων τοξικών ουσιών να παρουσιάζουν συχνά συλλοιμώσεις με τους δύο αυτούς ιούς.

Παρά τον γεγονός ότι η γενετήσια μετάδοση δεν αποτελεί κύριο ενοχοποιητικό παράγοντα διασποράς του HCV, παρατηρείται μία αρκετά μεγάλη διαφορά ως προς τον επιπολασμό της ηπατίτιδας C μεταξύ HIV θετικών ομοφυλόφιλων ανδρών (11-17%) και HIV αρνητικών ανδρών της ίδιας σεξουαλικής συμπεριφοράς (4-5%).

Από τις πρώτες καταγραφές των HCV-HIV συλλοιμώξεων έγινε αντιληπτή η επίδραση του HIV στη δυσμενή εξέλιξη της HCV λοίμωξης, ενώ μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η συλλοιμώξη με τον HIV εμπλέκεται στα αυξημένα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας από ηπατική ανεπάρκεια.

Σε ομάδα HCV θετικών ατόμων που είχαν προσβληθεί μέσω της παρεντερικής οδού, το ποσοστό μετάπτωσης της νόσου σε κίρρωση του ήπατος (κατόπιν παρακολούθησης 15 ετών) άγγιξε το 25% σε HIV θετικά άτομα, και μόλις το 6,5% σε HIV αρνητικά άτομα. Παρά το γεγονός ότι αν και ακόμη δεν έχει αποσαφηνισθεί η αιτιοπαθογένεια της ταχύτερης εξέλιξης της HCV λοίμωξης σε HIV θετικά άτομα, εργαστηριακά ο τίτλος HCV-RNA σε HIV θετικούς είναι υψηλότερος απ'ό,τι αυτός σε HIV αρνητικούς, με αποτέλεσμα την ταχύτερη εξέλιξη της HCV.

3.3 Άλλα είδη συλλοιμώξεων με HCV

► *Μικροβιακές*

- με *Gram αρνητικά βακτήρια* (E. coli, ψευδομόνας, πρωτέας, σιγκέλλα, σαλμονέλλα, κλεμπσιέλλα, γονόκοκκος, εντερόκοκκος, enterobacter κ.λ.π.)
- με *Gram θετικά βακτήρια* (πνευμονιόκοκκος, στρεπτόκοκκος, σταφυλόκοκκος κ.λ.π.)

- με *Αναερόβια* (βακτηριοειδή, κλωστηρίδια κ.λ.π.)
- με *σπειροχαίτες* (λεπτοσπείρωση, σύφιλη κ.λ.π.)
- με *μυκοβακτηρίδια* (φυματιώσεις, άτυπα)

▶ **Παρασιτικές**

- *Αμοιβάδωση*
- *Σχιστοσωμίαση*
- *Εχινοκοκκίαση*
- *Ελονοσία*
- *Λεισμανίαση*
- *Τοξοπλάσμωση κ.λ.π.*

▶ **Ρικετσιώσεις**

- *Πυρετός Q*
- *Πυρετός βραχυδών ορέων*

▶ **Μυκητιώσεις**

- *Candida*
- *Ασπέργιλλος*
- *Κρυπτόκοκκος κ.λ.π.*

4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΠΡΟΛΗΨΗ

Η μέχρι πρότινος μοναδική θεραπεία για τη λοίμωξη από την ηπατίτιδα ήταν η συνδυασμένη χορήγηση ιντερφερόνης-α (*IFN-α*) και του ιικού φαρμάκου ριμπαβιρίνη. Η θεραπεία αυτή βελτιστοποιήθηκε με την αντικατάσταση της ιντερφερόνης-α (*IFN-α*) από την πεγκυλιομένη ιντερφερόνη-α (*PEG-IFN-α*) σε διπλή θεραπεία γεγονός που φαίνεται να μειώνει το ποσοστό και τη σοβαρότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών, αλλά και να αυξάνει την αποτελεσματικότητα της αγωγής.

Στην οξεία ηπατίτιδα C συνίσταται η όσο το δυνατόν γρηγορότερη θεραπεία της, με σκοπό τη μείωση του ποσοστού μετάπτωσης σε χρονιότητα. Με τη χορήγηση αυτής της συνδυαστικής θεραπείας, επιτυγχάνεται μακροχρόνια ιολογική ανταπόκριση, ούτως ώστε ένα 50-60% των ασθενών να θεραπεύονται. Η εκκρίωση του ιού έχει άμεση συνάρτηση με το γονότυπο. Από μελέτες φάνηκε ότι για τους γονότυπους 2 και 3 το ποσοστό επιτυχίας αυτής της θεραπείας ανέρχεται στο 80%, σε αντίθεση με τους γονότυπους 1 και 4 όπου το ποσοστό επιτυχίας ανέρχεται στο 40%. Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών που έλαβε συνδυασμένη θεραπεία και δεν ανταποκρίθηκε, ανέρχεται στο 40-50%.

Τα άτομα που τελικά θα αναπτύξουν κίρωση ή καρκίνο του ήπατος πιθανολογείται ότι θα χρειαστούν μεταμόσχευση ήπατος, ωστόσο ο ιός συνήθως επανεμφανίζεται μετά τη μεταμόσχευση.

Οι πρόοδοι στις ερευνητικές προσπάθειες κατανόησης του κύκλου ζωής του HCV έχουν οδηγήσει σε παραγωγή και άλλων εναλλακτικών φαρμάκων (τα οποία δοκιμάζονται σε κλινικές μελέτες διαφόρων φάσεων), ανάγκη που ήταν φανερή καθώς και αυτή της εξεύρεσης εμβολίου.

Μέχρι και το 2011 δεν υπήρχε κάποιο εμβόλιο για την ηπατίτιδα C. Τα εμβόλια είναι ακόμη υπό ανάπτυξη, ενώ ορισμένα από αυτά έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Από το 2011 περίπου 100 φαρμακευτικές αγωγές βρίσκονται ήδη στο στάδιο της ανάπτυξης για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας C.

Οι αναστολείς πρωτεάσης θεωρούνται η πιο πρόσφατη επιλογή σε συνδυασμένη θεραπεία. Οι πρώτοι ενδεικνυόμενοι αναστολείς πρωτεάσης για θεραπεία σε HCV λοίμωξης, κυρίως, όσον αφορά τον γονότυπο 1, για τριπλή θεραπεία με πεγκυλιομένη ιντερφερόνη και

ριμπαβιρίνη, είναι τα telaprevir και boceprevir, τα οποία πήραν έγκριση το 2011 από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων (*FDA*).

Επίσης, στα τέλη του 2013, το *FDA* ενέκρινε δύο νέα φάρμακα, το simeprevir έναν *NS3/4A* αναστολέα πρωτεάσης δεύτερης γενιάς, το οποίο χρησιμοποιείται σε συνδιαστική θεραπεία με *PEG-IFN-α* και ριμπαβιρίνη, καθώς και το sofosbuvir για τη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας *C*, ως συστατικό συνδιαστικού αντιικού θεραπευτικού σχήματος. Είναι το πρώτο φάρμακο που έχει αποδείξει την ασφάλεια για την αποτελεσματική θεραπεία σε ορισμένους γονότυπους, χωρίς την ανάγκη συγχορήγησης ιντερφερόνης.

Ωστόσο, όπως αναφέρεται σε πρόσφατη μελέτη, η θεραπεία της χρόνιας λοίμωξης δεν είναι πάντα εφικτή και η μακρά διάρκεια της νόσου συνδέεται με πληθώρα κοινωνικών και ατομικών προβλημάτων για τον ασθενή, ενώ επιπρόσθετα επιφέρει οικονομικές επιπτώσεις τόσο στα υγειονομικά συστήματα όσο και στην κοινωνία γενικότερα. Στην Ελλάδα, το μέσο ετήσιο κόστος στο δημόσιο τομέα για θεραπεία ανέρχεται στα 758,1€/ασθενή, ενώ στον ιδιωτικό τομέα ανέρχεται στα 1285,5/ασθενή [4].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφάλαιο αυτό, που αποτελεί την έρευνα πεδίου της παρούσας διδακτορικής διατριβής, μελετώνται Επιδημιολογικά στοιχεία της λοίμωξης από τον ιό της Ηπατίτιδος C (*Hepatitis C Virus – HCV*) σε σύνολο 1543 ασθενών θετικών ως προς την ηπατίτιδα C, που προσήλθαν στο Τμήμα Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων & AIDS κατά τη χρονική περίοδο 2004-2012.

Στο πλαίσιο της περιγραφικής στατιστικής και επιδημιολογίας, **οι μελετούμενες μεταβλητές**, οι οποίες επιλέχθηκαν προς στατιστική επεξεργασία και αξιολόγηση, είναι:

- ▶ η Χρήση Ενδοφλεβίων Ναρκωτικών
- ▶ τα Σεξουαλικά Μεταδιδόμενα Νοσήματα (*Sexually Transmitted Diseases - STD*),
- ▶ η Ηλικία,
- ▶ το Φύλο,
- ▶ το Μορφωτικό επίπεδο,
- ▶ η Καταγωγή,
- ▶ ο Σεξουαλικός προσανατολισμός,
- ▶ ο Αριθμός των συντρόφων το τελευταίο 6μηνο,
- ▶ η Χρήση Προφυλακτικού κατά την σεξουαλική επαφή
- ▶ η παράμετρος του «Οικονομικού Πρόσφυγα».

Παράλληλα καταγράφηκαν και πρόσθετες πληροφορίες των υπό εξέταση ατόμων, όπως η αιτία προσέλευσης (παραπομπή από σωφρονιστικά ιδρύματα, κέντρα απεξάρτησης, κ.ά.), καθώς και το εργασιακό τους καθεστώς.

Οι εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση του HCV είναι η ανοσοενζυμική μέθοδος αναζήτησης αντισωμάτων (*ELISA*), η επιβεβαιωτική τεχνική ανοσοαποτύπωσης (*LIA*) και η μέτρηση ιικού φορτίου (όπου αυτό κρίθηκε σκόπιμο σε περιπτώσεις κυρίως αμφιβόλου αποτελέσματος) μέσω των ποσοτικών μεθόδων RNA-bDNA και mRNA RT-PCR.

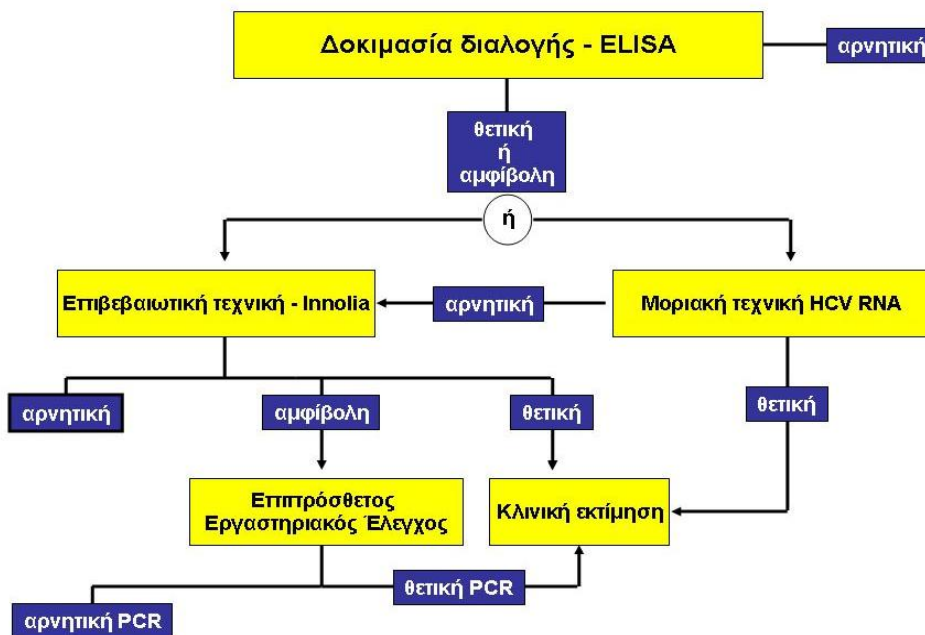
1. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

Οι εργαστηριακές τεχνικές που εφαρμόζονται για τη διάγνωση της ηπατίτιδας C είναι ορολογικές τεχνικές για τον εντοπισμό αντισωμάτων έναντι του ιού –Elisa, CMIA, ECMIA, 3^{ης} ή 4^{ης} γενιάς με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, οι οποίες όμως δεν μπορούν να κάνουν διάκριση ανάμεσα σε οξεία και χρόνια λοίμωξη.

Σε περίπτωση θετικού ή εξακολουθητικά αμφιβόλου αποτελέσματος εφαρμόζονται επιβεβαιωτικές τεχνικές.

Ως τέτοιες ορίζονται δοκιμασίες που βασίζονται στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης WESTERN BLOT – RIBA, LIA – και ο μοριακός ποιοτικός ή ποσοτικός έλεγχος.

Τα αντισώματα έναντι του HCV εμφανίζονται σε όλους τους ασθενείς περίπου σε 1 μήνα μετά την οξεία λοίμωξη, με εξαίρεση τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Στο διαγνωστικό αυτό «παράθυρο» οι μοριακές τεχνικές για HCV-RNA ανιχνεύουν συνύθως το θετικό δείγμα.



Εικόνα 1.2.: Αλγόριθμος εργαστηριακού ελέγχου για την HCV λοίμωξη

Όσον αφορά στο εργαστηριακό μέρος αυτής της μελέτης ακολουθήθηκε ο αλγόριθμος που προαναφέρθηκε (εικόνα 1.2.) και εφαρμόστηκαν οι τεχνικές που περιγράφονται πιο κάτω.

1.1. Ανίχνευση HCV αντισωμάτων με μικροσωματιδιακή ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας

▪ Σκοπός χρήσης

Για την ποιοτική ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C (*anti-HCV*) χρησιμοποιήθηκε ως screening τεχνική η Μικροσωματιδιακή Ανοσοεξέταση Χημειοφωταύγειας (*CMIA*) σε ανθρώπινο ορό και πλάσμα. Η εξέταση αυτή εκτελείται στον αυτόματο ανοσοχημικό αναλυτή ARCHITECT i System (*ABBOTT, ΗΠΑ*).

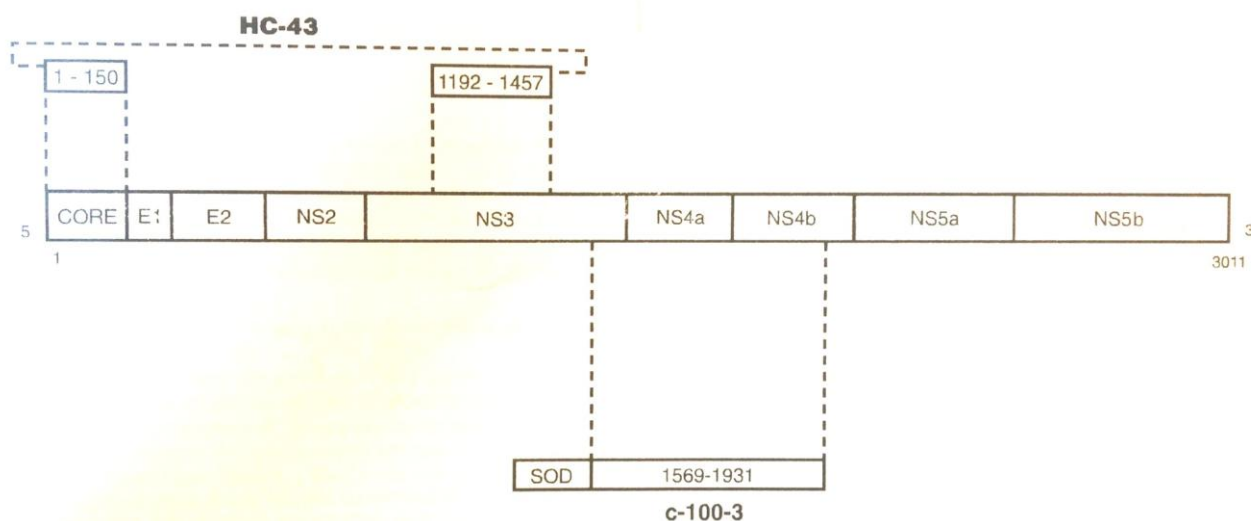
▪ Περίληψη και επεξήγηση της εξέτασης

Οι ανοσοεξετάσεις χημειοφωταύγειας είναι μία παραλλαγή της αρχής της ανοσοενζυμικής ανάλυσης (*EIA*). Στη στερεά φάση της *EIA*, που περιγράφηκαν για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1970, χρησιμοποιούν μία επιφάνεια επικαλυμμένη με αντιγόνα ή/και αντισώματα για να δεσμεύσουν συμπληρωματικούς παράγοντες. Ο δεσμευμένος πλέον παράγοντας ανιχνεύεται με μια σειρά αντιδράσεων αντιγόνων-αντισωμάτων. Στην τελική αντίδραση της *Anti-HCV*, χρησιμοποιούνται δεσμευμένα συνδεδετικά διαλύματα με σήμανση ακριδίνης για τη δημιουργία σήματος χημειοφωταύγειας.

Η εξέταση *Anti-HCV* έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση αντισωμάτων εναντίον ενδεχομένων αντιγόνων των δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών του *HCV*. Στην εικόνα 1.1.1. απεικονίζεται η σχέση μεταξύ των ανασυνδυασμένων αντιγονικών επιτόπων *HCV* στην εξέταση *Anti-HCV* και των ενδεχομένων δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών του *HCV*.

- **HCr43:** Το αντιγόνο HCr43, που παράγεται βιοτεχνολογικά με τη χρήση βακτηριδίου *Escherichia coli* (*E. Coli*), αποτελείται από δύο περιοχές κωδικοποίησης της γονιδιακής αλληλουχίας NS3. Η δεύτερη περιοχή αντιπροσωπεύει τα αμινοξέα 1192 έως 1457 (33c) της αλληλουχίας *HCV*. Η πρώτη από τις δύο περιοχές αντιπροσωπεύει τα αμινοξέα 1 έως 150 (*CORE*) της αλληλουχίας *HCV*.
- **c100-3:** Το αντιγόνο c100-3 είναι μία ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *HCV* που παράγεται βιοτεχνολογικά με τη χρήση του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (*ζυμομύκητας*). Η

γονιδιακή οργάνωση των φλαβοϊών υποδηλώνει ότι η κλωνοποιημένη αλληλουχία περιέχεται μέσα στις ενδεχόμενες μη δομικές περιοχές (NS3 και NS4) του HCV. Η πρωτεΐνη c100-3 είναι μία πρωτεΐνη χιμαιρικής σύντηξης με 154 αμινοξέα της ανθρώπινης υπεροξειδικής δισμουτάσης (*hSOD*), πέντε αμινοξέα συνδέτες, τα αμινοξέα με αριθμούς από 1569 έως 1931 της πολυπρωτεΐνης HCV, καθώς και πέντε επιπλέον αμινοξέα συνδέτες στο καρβοξυλικό άκρο.



Εικόνα 1.1.1.: Σχέση μεταξύ των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HC-43, C-100-3 και των ενδεχομένων δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών του γονιδιώματος του HCV.

- **Αρχές του προσδιορισμού**

Η εξέταση αυτή αποτελεί Μικροσωματιδιακή Ανοσοεξέταση Χημειοφωταύγειας (CMIA) δύο σταδίων για την ποιοτική ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του HCV σε ανθρώπινο ορό και πλάσμα.

Στο πρώτο στάδιο, συνδυάζονται παραμαγνητικά μικροσωματίδια επικαλυμμένα με ανασυνδυασμένα αντιγόνα του HCV και αραιωτικό διάλυμα εξέτασης. Τα τυχόν αντισώματα έναντι του HCV (anti-HCV) που υπάρχουν στο δείγμα (ορός) δεσμεύονται στα μικροσωματίδια που είναι επικαλυμμένα με HCV αντιγόνα. Μετά την έκπλυση, στο δεύτερο στάδιο, προστίθεται συνδετικό αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου αντισώματος με επισήμανση ακριδίνης. Μετά από

άλλον ένα κύκλο έκπλυσης, προστίθενται το διάλυμα αρχικής φωτοενεργοποίησης (pre-trigger) και το διάλυμα φωτοενεργοποίησης (trigger) στο μίγμα αντίδρασης.

Η αντίδραση χημειοφωταύγειας που προκύπτει μετράται σε σχετικές μονάδες φωτεινότητας (RLU). Υπάρχει μία ευθέως ανάλογη σχέση μεταξύ της ποσότητας των αντισωμάτων έναντι του HCV στο δείγμα και των RLU που ανιχνεύονται από το οπτικό σύστημα του μηχανήματος. Η παρουσία ή η απουσία αντισωμάτων έναντι του HCV στο δείγμα προσδιορίζεται με τη σύγκριση του σήματος χημειοφωταύγειας στην αντίδραση με το σήμα ορίου θετικότητας που έχει προσδιοριστεί με προηγούμενη βαθμονόμηση. Εάν το σήμα χημειοφωταύγειας στο δείγμα είναι μεγαλύτερο ή ίσο του σήματος ορίου θετικότητας, το δείγμα θεωρείται αντιδρών σε anti-HCV.

▪ *Αντιδραστήρια*

| <i>Συστατικό</i> | <i>Περιγραφή</i> |
|--------------------------|---|
| MICROPARTICLES | μικροσωματίδια επικαλυμμένα με HCV αντιγόνα σε ρυθμιστικό διάλυμα MES. Ελάχιστη συγκέντρωση: 0,14% στερεά. Συντηρητικό: αντιμικροβιακοί παράγοντες |
| CONJUGATE | συνδεδετικό διάλυμα αντισωμάτων IgG/IgM ποτιτικού με επισήμανση ακριδίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα MES. Ελάχιστη συγκέντρωση IgG 8 ng/mL, IgM 0,8 ng/mL. Συντηρητικό: αντιμικροβιακοί παράγοντες |
| ASSAY DILUENT | αραιωτικό διάλυμα εξέτασης Anti-HCV που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με πρωτεϊνικούς σταθεροποιητές. Συντηρητικό: αντιμικροβιακοί παράγοντες |
| Βαθμονομητής Anti-HCV | Calibrator |
| Πρότυπα ελέγχου Anti-HCV | Controls |
| PRE-TRIGGER SOLUTION | περιέχει 1,32% w/v υπεροξειδίου του υδρογόνου |
| TRIGGER SOLUTION | περιέχει 0,35N υδροξειδίου του νατρίου |
| WASH BUFFER | περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος. Συντηρητικό: αντιμικροβιακοί παράγοντες |
| REACTION VESSELS | |
| SAMPLE CUPS | |
| SEPTUM | |
| REPLACEMENT CAPS | |

- ***Ερμηνεία των αποτελεσμάτων***

Στην εξέταση υπολογίζεται αποτέλεσμα που βασίζεται σε S/co.

- Υπολογισμός ορίου θετικότητας: Μέση τιμή RLU βαθμονομητή
 $1 \times 0,074 = \text{RLU ορίου θετικότητας}$
- $\text{S/co} = \text{RLU δείγματος} / \text{RLU ορίου θετικότητας}$

Τα δείγματα με τιμές S/co <1,00 θεωρούνται μη αντιδρώντα, ενώ τα δείγματα με τιμές S/co $\geq 1,00$ θεωρούνται αντιδρώντα. Τα κατ' επανάληψη αντιδρώντα δείγματα anti-HCV διερευνώνται περαιτέρω, με συμπληρωματικές εξετάσεις, όπως άλλες ανοσοεξετάσεις και εξετάσεις ανοσοαποτύπωσης ειδικές για HCV ή συνδυασμό αυτήν ή/και μοριακών τεχνικών.

- ***Διαγνωστική ειδικότητα και διαγνωστική ευαισθησία της τεχνικής***

Η διαγνωστική ειδικότητα και η διαγνωστική ευαισθησία στη συγκεκριμένη τεχνική εκτιμήθηκαν από τα αποτελέσματα 10.624 δειγμάτων ορού και πλάσματος. Η ειδικότητα ήταν 99,60% (10.361/10.403) με διάστημα εμπιστοσύνης 95% από 99,45% έως 99,71%. Η ειδικότητα (που ελέγχθηκε από διαφορετικές θέσεις) κυμαινόταν μεταξύ 99,20% (496/500) και 99,70% (1994/2000). Η ευαισθησία ήταν 99,10% με διάστημα εμπιστοσύνης 95% από 96,77% έως 99,89%.

1.2. Ανίχνευση HCV αντισωμάτων με ανοσοαποτύπωση

- ***Σκοπός χρήσης***

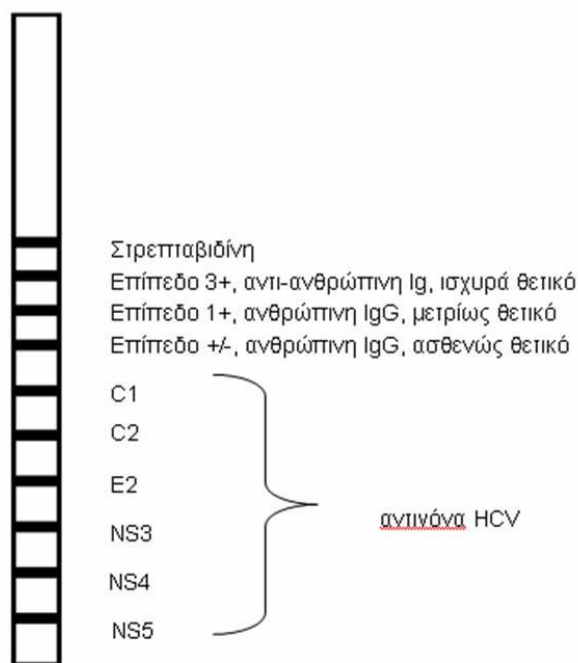
Ως επιβεβαιωτική τεχνική χρησιμοποιήθηκε η τεχνική INNO-LIA HCV Score (INNOGENETICS, Βέλγιο) που αποτελεί δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης σε ζώνες (LIA) για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C στον ανθρώπινο ορό ή το πλάσμα. Προορίζεται για να χρησιμοποιείται ως επιβεβαιωτική εξέταση σε δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος, που έχουν βρεθεί να αντιδρούν στις εξετάσεις διαλογής έναντι του ιού HCV. Στην εργαστηριακή πρακτική η μέθοδος αυτή ταξινομεί περίπου το 75% των αδιευκρίνιστων δειγμάτων των ανοσοενζυμικών μεθόδων ELISA.

▪ **Περίληψη και επεξήγηση της εξέτασης**

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι μία δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης σε ζώνες, 3^{ης} γενεάς, η οποία χρησιμοποιεί αντιγόνα HCV, που προέρχονται από την περιοχή του πυρηνοκασιδίου, την υπερμεταβλητή περιοχή E2 (HVR), την περιοχή ελικάσης NS3 και τις περιοχές NS4A, NS4B και NS5A.

Τα αντιγόνα βρίσκονται επικαλυμμένα με τη μορφή 6 διακριτών ζωνών επάνω σε μία νάιλον ταινία, που είναι τοποθετημένη επάνω σε πλαστικό στέλεχος. Επιπλέον, κάθε ταινία φέρει τέσσερις ζώνες μαρτύρων:

- ✓ ζώνη μάρτυρα στρεπταβιδίνης
- ✓ Θετικός Μάρτυρας 3+ (αντι-ανθρώπινη Ig)
- ✓ Θετικός Μάρτυρας 1+ (ανθρώπινη IgG) και
- ✓ τη ζώνη αποκοπής (cut-off) ± (ανθρώπινη IgG)



Εικόνα 1.2.1.: Ταινία εξέτασης (strip) τεχνικής ανοσοαποτύπωσης

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αρχή των ενζυμικών ανοσοδοκιμασιών. Το αραιωμένο προς εξέταση δείγμα (ορός) επωάζεται μέσα σε ένα σκαφίδιο μαζί με την ταινία εξέτασης (strip) LIA. Τα αντισώματα HCV, εάν υπάρχουν στο δείγμα, συνδέονται με τα αντιγόνα HCV των ζωνών της ταινίας. Στη συνέχεια προστίθεται συζευγμένο αντι-ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης αιγός IgG (H+L), κεκαθαρμένης μέσω χημικής συγγένειας και επισημασμένης με αλκαλική φωσφατάση, το οποίο αντιδρά με τα ειδικά HCV συμπλέγματα αντιγόνου/αντισώματος, εάν αυτά έχουν προηγουμένως σχηματιστεί. Κατά την επώαση με το ενζυμικό χρωμογόνο, αναπτύσσεται καστανό χρώμα, του οποίου η ένταση είναι ανάλογη προς την ποσότητα των αντισωμάτων έναντι του HCV, που δεσμεύτηκαν από το δείγμα σε οποιαδήποτε από τις ζώνες (Εικόνα 1.2.1.). Η ανάπτυξη του χρώματος τερματίζεται με προσθήκη αραιού θειϊκού οξέος.

▪ **Αντιδραστήρια**

| Συστατικό | Περιγραφή |
|--|---|
| Ταινίες εξέτασης (strips) | Περιέχονται 20 ταινίες εξέτασης (strips) INNO-LIA καλυμμένες με αντιγόνα HCV. |
| Υγρό διάλυμα αραιώσης δείγματος | Περιέχει πράσινου χρώματος ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού που περιέχει χλωριούχο νάτριο, απορρυπαντικό, πρωτεϊνικούς σταθεροποιητές βοός και 0,3% χλωροακεταμίδη (CAA) ως συντηρητικό. |
| Διάλυμα σύζευξης (έτοιμο προς χρήση) | Περιέχει κόκκινου χρώματος αντιανθρώπινη IgG αιγός επισημασμένη με αλκαλική φωσφατάση, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris που περιέχει σταθεροποιητές (βοός), απορρυπαντικό και 0,01% μεθυλισοθιαζολόνη (MIT) / 0,1% CAA ως συντηρητικό. |
| Αρνητικός Μάρτυρας | Περιέχει θεμέλια ύλη (matrix) ανθρώπινης προέλευσης με 0,01% MIT / 0,1% CAA ως συντηρητικό. |
| Θετικός Μάρτυρας | Περιέχει απενεργοποιημένο ανθρώπινο ορό, θετικό για αντισώματα HCV με 0,01% MIT / 0,1% CAA ως συντηρητικό. |
| Χρωμογόνο BCIP/NBT (έτοιμο προς χρήση) | Περιέχει 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο φωσφορικό και nitroblue tetrazolium μέσα σε διμεθυλοφορμαμίδιο, με 0,01% MIT / 0,1% CAA ως συντηρητικό. |
| Διάλυμα Παύσης | Περιέχει θειϊκό οξύ 0,1 mol/l. |
| Διάλυμα έκπλυσης | Περιέχει μπλε χρώματος ρυθμιστικό διάλυμα Tris, που περιέχει χλωριούχο νάτριο, απορρυπαντικό και 0,02% βρωμο-νιτρο-διοξάνιο ως συντηρητικό, το οποίο αραιώνεται 5X σε απεσταγμένο νερό. Το αραιωμένο διάλυμα πλύσης παραμένει σταθερό για 2 εβδομάδες, εφ' όσον φυλάσσεται στους 2 - 8°C. |

| | |
|---|---|
| Δίσκος Επώασης | Ο κάθε ένας με 11 σκαφίδια. |
| Αυτοκόλλητα καλύμματα | |
| Φύλλο αναφοράς | Για την φύλαξη των χρωματισμένων ταινιών εξέτασης (strips). δεδομένων |
| Κάρτα ανάγνωσης | Για την ταυτοποίηση των γραμμών των αντιγόνων που παρουσιάζουν αντίδραση. |
| Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό | |
| Πιπέττες σταθερού όγκου 10μl και πιπέττες μεταβλητού όγκου 20-200 μl, και 200-1000 μl, καθώς και τα αντίστοιχα ρύγχη μίας χρήσεως | |
| Περιστροφικός αναδευτήρας ή ανακινητήρας τύπου Rocker | |
| Συσκευή Vortex ή αντίστοιχη | |
| Ογκομετρικοί κύλινδροι: 10, 25, 50 και 100 ml | |
| Λαβίδα για τον χειρισμό των ταινιών | |
| Χρονόμετρο | |

- **Διαδικασία προσδιορισμού (η περιγραφόμενη τεχνική πραγματοποιήθηκε από αυτόματο μηχάνημα - TECAN AUTOLIA)**

Από το Εργαστήριο επιλέχθηκε το πρωτόκολλο επώασης 16 ωρών.

1. Προστίθεται 1 ml Διαλύματος Αραίωσης Δείγματος σε κάθε «σκαφίδιο δείγματος»
2. Προστίθενται 10 μl από το δείγμα (ορός) ή από τον μάρτυρα, στο σκαφίδιο με την αντίστοιχη σήμανση.
3. Τοποθετείται μία ταινία σε κάθε σκαφίδιο εξέτασης.
4. Καλύπτονται τα σκαφίδια με ειδικό αυτοκόλλητο κάλυμμα και επωάζονται επάνω σε αναδευτήρα NYXTA (16 ± 2 h) σε θερμοκρασία δωματίου (18 - 25°C).
5. Εκπλένεται κάθε ταινία εξέτασης 3 φορές (5 λεπτά) με 1 ml Διαλύματος έκπλυσης.
6. Προστίθεται 1 ml από το έτοιμο Διάλυμα Σύζευξης σε κάθε σκαφίδιο.
7. Επωάζεται με το διάλυμα Σύζευξης τοποθετώντας το δίσκο επάνω σε αναδευτήρα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18 - 25°C).
8. Πλένονται οι ταινίες εξέτασης 3 φορές (5 λεπτά) με 1 ml Διαλύματος Πλύσης.
9. Προστίθεται 1 ml από το έτοιμο Διάλυμα Χρωμογόνου σε κάθε σκαφίδιο.
10. Γίνεται επώαση με το Χρωμογόνο τοποθετώντας το δίσκο επάνω σε αναδευτήρα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18 - 25°C).

11. Αφαιρείται το υγρό και προστίθεται 1ml Διαλύματος Παύσης σε κάθε σκαφίδιο.
12. Επιάζεται με το Διάλυμα Παύσης της Αντίδρασης, τοποθετώντας το δίσκο επάνω σε αναδευτήρα για 10 έως 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18 - 25°C).
13. Αφαιρείται το Διάλυμα Παύσης.
14. Χρησιμοποιώντας λαβίδα, απομακρύνονται οι ταινίες (strips) από τα σκαφίδια και τοποθετούνται επάνω σε απορροφητικό χαρτί, έτσι ώστε η επικαλυμμένη με μεμβράνη όψη τους, να είναι ορατή. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων γίνεται αμέσως μόλις οι ταινίες (strips) στεγνώσουν τελείως. Για να επιταχυνθεί το στέγνωμα, οι ταινίες τοποθετούνται επί 30 λεπτά μέσα σε ξηρό κλίβανο στους 37°C ή σε συσκευή θερμού αέρα (στεγνωτήρας μαλλιών) επί 1 λεπτό.

▪ **Ανάγνωση αποτελεσμάτων**

Οι ονομασίες και οι θέσεις των ζωνών των αντιγόνων και των μαρτύρων που φέρει η ταινία εξέτασης είναι οι προαναφερόμενες στην εικόνα 1.2.1.

Η ένταση της αντίδρασης στις ζώνες μαρτύρων κάθε ταινίας εξέτασης (strip) χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του επιπέδου αντιδραστικότητας για κάθε αντιγόνο στην ταινία (strip). Η αξιολόγηση του επιπέδου αντιδραστικότητας γίνεται ξεχωριστά για κάθε ταινία εξέτασης (strip).

| Ένταση αντίδρασης των ζωνών αντιγόνων (R) | | Επίπεδο |
|--|-------------------|----------------|
| Χαμηλότερη του \pm | $R < \pm$ | - |
| Ίση με \pm | $R = \pm$ | \pm |
| Υψηλότερη του \pm , αλλά χαμηλότερη ή ίση του 1+ | $\pm < R \leq 1+$ | 1+ |
| Υψηλότερη του 1+ αλλά χαμηλότερη του 3+ | $1+ < R < 3+$ | 2+ |
| Ίση με 3+ | $R = 3+$ | 3+ |
| Υψηλότερη του 3+ | $R > 3+$ | 4+ |

▪ **Επικύρωση**

Για να είναι έγκυρη η εξέταση, θα πρέπει να πληρούνται οι ακόλουθες προϋποθέσεις:

1. Η ταινία (*strip*) του Θετικού Μάρτυρα να παρουσιάζει αντίδραση επιπέδου τουλάχιστον 1+ στις ζώνες αντιγόνων C1, C2, NS3 και NS4. Οι ζώνες αντιγόνων E2 και NS5 μπορεί να εμφανίζουν αρνητικό επίπεδο.
2. Τα επίπεδα αντίδρασης στην ταινία του Αρνητικού Μάρτυρα θα πρέπει να είναι αρνητικά (καμία αντίδραση ή αντίδραση εντάσεως χαμηλότερης του επιπέδου μάρτυρα ± για όλες τις ζώνες των HCV αντιγόνων).

Για να είναι έγκυρη η ταινία:

1. Θα πρέπει να είναι εμφανή τα επίπεδα μαρτύρων 1+ και ± καθώς και το ισχυρά θετικό επίπεδο 3+ του Θετικού Μάρτυρα.
2. Η ένταση για το επίπεδο μάρτυρα 3+ θα πρέπει να είναι υψηλότερη από εκείνη για το επίπεδο 1+ και η ένταση για το επίπεδο 1+ θα πρέπει να είναι υψηλότερη από εκείνη για το επίπεδο ±.
3. Η ζώνη μάρτυρα για την αντι-στρεπταβιδίνη θα πρέπει να εμφανίζεται αρνητική.

▪ **Ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

Το δείγμα είναι ΑΡΝΗΤΙΚΟ ως προς τα αντισώματα HCV:

- εάν όλες οι ζώνες των HCV αντιγόνων εμφανίζουν αρνητικά επίπεδα αντιδραστικότητας
- εάν μόνο μία από τις ζώνες των HCV αντιγόνων παρουσιάζει αντιδραστικότητα επιπέδου ±, εκτός εάν πρόκειται για τη ζώνη NS3.

Το δείγμα είναι ΘΕΤΙΚΟ ως προς το αντίσωμα HCV:

- εάν τουλάχιστον δύο από τις ζώνες των HCV αντιγόνων παρουσιάζουν αντιδραστικότητα τουλάχιστον επιπέδου ± ή μεγαλύτερη.

Το δείγμα κρίνεται ΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΟ ως προς το αντίσωμα HCV:

- εάν μία από τις ζώνες των HCV παρουσιάζει επίπεδο αντιδραστικότητας 1+ ή υψηλότερο
- εάν το επίπεδο αντιδραστικότητας της ζώνης NS3 είναι \pm ή υψηλότερο και όλες οι υπόλοιπες ζώνες αντιγόνων είναι αρνητικές.

▪ ***Ειδικότητα και ευαισθησία της τεχνικής***

Η τεχνική διαθέτει υψηλή ευαισθησία για όλους τους διαφορετικούς γονότυπους 100% και υψηλή ειδικότητα σε επιλογές δοκιμών αρνητικών αιμοδοτών σε ποσοστό 94,5%.

1.3. Ανίχνευση HCV με μοριακές τεχνικές

1.3.α. Προσδιορισμός HCV RNA – bDNA

▪ ***Σκοπός χρήσης***

Ο προσδιορισμός VERSANT HCV RNA 3.0 (bDNA) που χρησιμοποιήθηκε, είναι ένας προσδιορισμός ανιχνευτή νουκλεϊκού οξέος τύπου σάντουιτς, με ενίσχυση σήματος στον αναλυτή bDNA του συστήματος 340 (SIEMENS, Γερμανία) για την άμεση ποσοτικοποίηση του RNA του ανθρώπινου ιού της ηπατίτιδας C (HCV RNA) στον ανθρώπινο ορό ή στο πλάσμα.

▪ ***Αρχές του προσδιορισμού***

Απελευθερώνεται το γονιδιακό RNA του HCV από τα σωματίδια του ιού και το RNA συλλαμβάνεται σε μια μικροϋποδοχή από ένα σύνολο ειδικών, συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών σύλληψης.

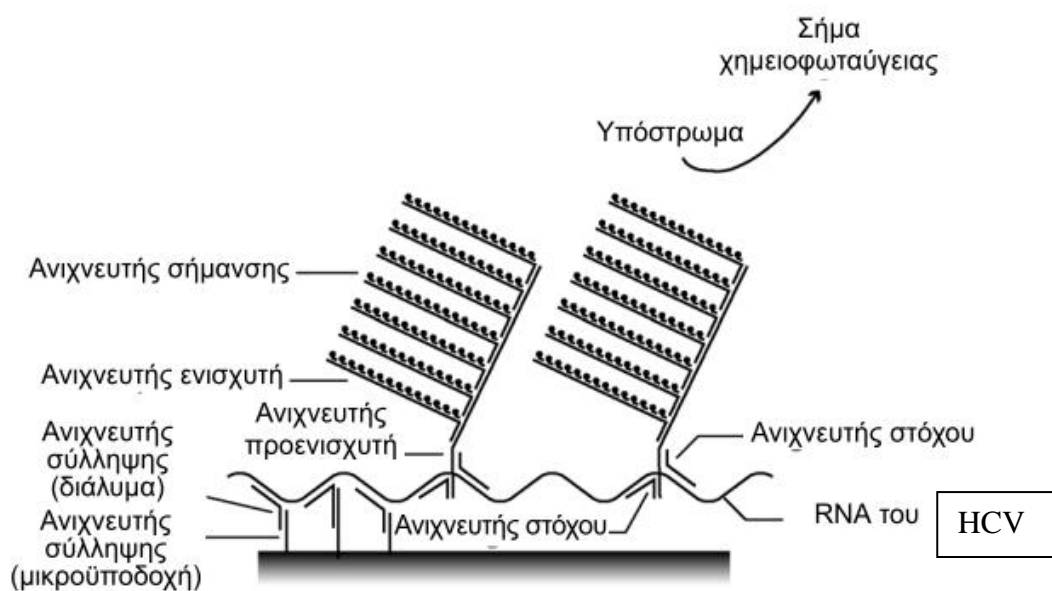
Ένα σύνολο ανιχνευτών στόχου υβριδίζεται τόσο στους ανιχνευτές του ιικού RNA όσο και στους ανιχνευτές προενισχυτή. Οι ανιχνευτές σύλληψης και οι ανιχνευτές στόχου δεσμεύονται στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5'-UTR) και στην περιοχή πυρήνα (CORE) του γονιδιώματος του HCV.

Ο ανιχνευτής ενισχυτή υβριδίζεται ακολούθως στον προενισχυτή, σχηματίζοντας ένα διακλαδισμένο σύμπλοκο (branchet) DNA (bDNA).

Κατόπιν υβριδίζονται πολλαπλά αντίγραφα ενός ανιχνευτή σημασμένου με αλκαλική φωσφατάση (AP) με αυτό το ακινητοποιημένο σύμπλοκο. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με επώαση του δεσμευμένου στην AP συμπλόκου με ένα χημειοφωταυγές υπόστρωμα.

Η εκπομπή του φωτός σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του RNA του HCV που υπάρχει σε κάθε δείγμα και τα αποτελέσματα καταγράφονται ως μονάδες σχετικού φωτός (RLU) από τον αναλυτή bDNA.

Μία πρότυπη καμπύλη ορίζεται από την εκπομπή του φωτός από πρότυπα που περιέχουν γνωστές συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένου μονόκλωνου φάγου DNA. Οι συγκεντρώσεις του RNA του HCV σε δείγματα προσδιορίζονται από αυτή την πρότυπη καμπύλη.



Εικόνα 1.3.α.1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας υβριδισμού ριβονουκλεικού οξέος τύπου sandwich.

- *Αντιδραστήρια*

| Σύμβολο | Συστατικό | Περιγραφή |
|-------------------------------|---------------------------------|---|
| LYSIS | Αντιδραστήριο λύσης | Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεϊνών με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| LYSIS DIL | Αραιωτικό λύσης | Διάλυμα πρωτεϊνάσης K με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| CAPTR PROBE | Ανιχνευτές σύλληψης | Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| TARGET PROBE | Ανιχνευτές στόχου | Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| WASH A | Διάλυμα έκπλυσης A | Ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| WASH B | Διάλυμα έκπλυσης B | Ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| CAPTR WELL | Υποδοχές σύλληψης | Μικροϋποδοχές πολυστυρενίου επικαλυμμένες με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια |
| BARRIER FILM | Μεμβράνη φραγμού | Φύλλα πολυαιθυλενίου υψηλής πυκνότητας |
| PRE-AMP/AMP DIL | Αραιωτικό προενισχυτή/ ενισχυτή | Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεϊνών με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| LABEL DIL | Αραιωτικό σήμανσης | Ρυθμιστικό διάλυμα πρωτεϊνών με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| DEXTRAN SO₄ | Θεική δεξτράνη | Διάλυμα θεικής δεξτράνης 40% με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά 2°C έως 8°C |
| PRE-AMP PROBE | Ανιχνευτές προενισχυτή | Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| AMP PROBE | Ανιχνευτής ενισχυτή | Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| SUBS | Υπόστρωμα | Χημειοφωταυγές υπόστρωμα (Lumi-Phos Plus) |
| SUBS ENHANCER | Βελτιωτικό υποστρώματος | Υδατικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| LABEL PROBE | Ανιχνευτής σήμανσης | Ενζυμικά σημασμένα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| CONTROL HI + | Θετικός μάρτυρας υψηλών τιμών | Ανθρώπινο πλάσμα που περιέχει ανασυνδυασμένο μονόκλωνο φάγο DNA με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| CONTROL LO + | Θετικός μάρτυρας χαμηλών τιμών | Ανθρώπινο πλάσμα που περιέχει HCV επεξεργασμένο με BPL με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| CONTROL - | Θετικός μάρτυρας χαμηλών τιμών | Ανθρώπινο πλάσμα μη αντιδρών για τον HCV με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| STANDARD A | Πρότυπα A, D | Ανθρώπινο πλάσμα που περιέχει ανασυνδυασμένο μονόκλωνο φάγο DNA με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| STANDARD D | | |
| STANDARD B | Πρότυπα B, C | Ανθρώπινο πλάσμα που περιέχει ανασυνδυασμένο μονόκλωνο φάγο DNA με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |
| STANDARD C | | |
| STANDARD E | | |
| | Πρότυπο E | Ανθρώπινο πλάσμα που περιέχει ανασυνδυασμένο μονόκλωνο φάγο DNA με αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και άλλα συντηρητικά |

| |
|---|
| Ορολογικές πιπέτες των 10 mL σε στείρα συσκευασία |
| Πιπέτα 12 καναλιών με ικανότητα διανομής 50 έως 200 μL και αναλώσιμα δοχεία των 50 mL σε στείρα συσκευασία |
| Πιπέττα θετικής μετατόπισης με ικανότητα διανομής 1 έως 7 mL |
| Πιπέττες ακριβείας με ικανότητα διανομής 25 έως 1000 μL και αναλώσιμα ρύγγη |
| Αναλώσιμα σωληνάρια πολυπροπυλενίου |
| Κενές μικροϋποδοχές, μαύρες |
| Λευκαντικό, χωρίς άρωμα (5,25% υποχλωριώδες νάτριο) |
| Αναμείκτης περιδίνησης |
| Υδατόλουτρο ($37^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$) |
| Αιθανόλη 70% |

- **Διαδικασία προσδιορισμού**

Η διαδικασία αποτελείται από δύο κύριες δραστηριότητες: υβριδισμό των ανιχνευτών και μέτρηση της εξόδου φωτός.

Διαδικασία ημέρας 1:

Υβριδισμός των ανιχνευτών σύλληψης και στόχου

1. Τοποθετείται το αραιωτικό λύσης σε υδατόλουτρο $37 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ επί 10 έως 20 λεπτά ή έως ότου διαλυθούν τυχόν ορατοί κρύσταλλοι. Αναμειγνύεται το αραιωτικό διάλυμα λύσης αναστρέφοντας τη φιάλη αρκετές φορές.
2. Τοποθετούνται το αντιδραστήριο λύσης, οι ανιχνευτές σύλληψης και οι ανιχνευτές στόχου στον πάγκο εργασίας και φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Τοποθετούνται τα απομονωμένα δείγματα ορού, τα πρότυπα (A, B, C, D και E) και ένα φιαλίδιο από τον καθένα από τους μάρτυρες (*αρνητικός, χαμηλός θετικός και υψηλός θετικός*) σε κρύο νερό, έτσι ώστε να αποψυχθούν και κατόπιν να διατηρηθούν σε πάγο.
4. Παρασκευάζεται αντιδραστήριο δράσης λύσης σε ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 50 mL. Για μικρότερους όγκους, χρησιμοποιείται ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15 mL.
 - a) Προστίθεται ο όγκος που είναι κατάλληλος για τον αριθμό ταινιών που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό.

| Ταινίες υποδοχών σύλληψης | Δείγματα | Αραιωτικό λύσης | Αντιδραστήριο | Ανιχνευτές σύλληψης | Ανιχνευτές στόχου |
|---------------------------|----------|-----------------|---------------|---------------------|-------------------|
| 8 | 84 | 10,5 mL | 1,44 | 100 μL | 100 μL |
| 6 | 60 | 7,88 mL | 1,08 | 75 μL | 75 μL |
| 5 | 48 | 6,56 mL | 0,90 | 63 μL | 63 μL |
| 4 | 36 | 5,25 mL | 0,72 | 50 μL | 50 μL |
| 3 | 24 | 3,94 mL | 0,54 | 38 μL | 38 μL |
| 2 | 12 | 2,63 mL | 0,36 | 25 μL | 25 μL |

β) Πωματίζεται, κατόπιν αναστρέφεται το σωληνάριο 10 φορές, υποβάλλεται σε περιδύνη επί 5 δευτερόλεπτα και αναστρέφεται 10 φορές ακόμα για να αναμειχθεί. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου και απορρίπτεται ο αφρός. Απορρίπτεται το διάλυμα εάν δε χρησιμοποιηθεί εντός 2,5 ωρών.

5. Οι ταινίες υποδοχών σύλληψης τοποθετούνται σε μια πλάκα. Πιέζονται οι ταινίες υποδοχών σύλληψης σταθερά μέσα στην πλάκα έως ότου το επάνω μέρος των ταινιών να είναι επίπεδο. Αφαιρούνται οι γλωττίδες. Επιστρέφονται αμέσως οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες στη θήκη, σφραγίζονται, σημειώνεται η ημερομηνία και φυλάσσονται στους 2°C έως 8°C.
6. Χρησιμοποιούνται κενές, μαύρες μικροϋποδοχές ανάλογα με τις ανάγκες για την πλήρωση της πλάκας.
7. Τοποθετείται κάθε πλάκα προσδιορισμού στο εργαλείο προσανατολισμού δειγμάτων, όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο χειριστή .
8. Προστίθενται 100 μL αντιδραστηρίου εργασίας λύσης σε κάθε υποδοχή. Χρησιμοποιείται μια πιπέτα 12 καναλιών και πληρώνεται η πλάκα από τη σειρά Α προς τη σειρά Η.
9. Υποβάλλονται σε περιδύνη τα δείγματα, τα πρότυπα και οι μάρτυρες έτσι ώστε να αναμειχθούν.
10. Με χρήση μεταβλητής πιπέτας 25 έως 200 μL ή σταθερής πιπέτας 50 μL και νέου ρύγχους για κάθε δείγμα, μεταφέρονται 50 μL από κάθε δείγμα, πρότυπο ή μάρτυρα στην κατάλληλη υποδοχή σύλληψης σύμφωνα με το χάρτη πλακών:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| A | Std A | Std A | Std B | Std C | Std D | Std D | Std E | Std E | Std E | N-Ctl | L-PCtl | H-PCtl |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Το Std είναι πρότυπο A έως E, το N-Ctl είναι αρνητικός μάρτυρας, το L-PCtl και το H-PCtl είναι θετικός μάρτυρας χαμηλών και υψηλών τιμών, αντίστοιχα.

11. Επαναφέρονται αμέσως τα υπόλοιπα δείγματα και πρότυπα στους -60°C έως -80°C . Τα πρότυπα και τα δείγματα μπορούν να καταψυχθούν και να αποψυχθούν έως τέσσερις φορές. Απορρίπτεται το υπόλοιπο αρνητικό υλικό ελέγχου, χαμηλό θετικό υλικό ελέγχου και υψηλό θετικό υλικό που έχει αποψυχθεί.
12. Όταν ζητηθεί, τοποθετούνται οι πλάκες επάνω στο δίσκο φόρτωσης του αναλυτή. Εάν εκτελείται κύκλος ανάλυσης 8 ή λιγότερων ταινιών, χρησιμοποιούνται κενές, μαύρες μικροκυψελίδες όπως απαιτείται, για να συμπληρωθούν οι πλάκες αριστερά και δεξιά.
13. Τοποθετείται το συναρμολογημένο επίθεμα στεγανοποίησης πάνω σε κάθε πλάκα.
14. Επινύχεται επί 15 έως 18 ώρες (ολονυκτίως). Μετά από 15 ώρες, ο αναλυτής εισέρχεται σε τρόπο λειτουργίας αναμονής έως ότου προχωρήσει το επόμενο βήμα.

Διαδικασία ημέρας 2

Υβριδισμός των ανιχνευτών προενισχυτή και ενισχυτή

1. Βεβαιώνεται ότι οι φιάλες διαλύματος έκπλυσης A και έκπλυσης B διαθέτουν αρκετό διάλυμα για τον αριθμό ταινιών που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό. Προστίθεται διάλυμα ανάλογα με τις ανάγκες.

| <i>Ταινίες υποδοχών σύλληψης</i> | <i>Δείγματα</i> | <i>Διάλυμα έκπλυσης A</i> | <i>Διάλυμα έκπλυσης B</i> |
|----------------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| 8 | 84 | 440 mL (1 φιάλη) | 320 mL (1 φιάλη) |
| 6 | 60 | 440 mL | 320 mL |
| 5 | 48 | 440 mL | 320 mL |
| 4 | 36 | 440 mL | 320 mL |
| 3 | 24 | 220 mL | 200 mL |
| 2 | 12 | 220 mL | 160 mL |

2. Τοποθετείται το αραιωτικό διάλυμα προενισχυτή/ενισχυτή και η θειϊκή δεξτράνη σε ένα υδατόλουτρο θερμοκρασίας $37 \pm 2,5^\circ\text{C}$ επί 10 έως 60 λεπτά. Αναμειγνύεται περιστασιακά η θειϊκή δεξτράνη, ανακινώντας τη φιάλη με περιστροφικές κινήσεις. Διατηρούνται σε θερμοκρασία $37 \pm 2,5^\circ\text{C}$ μέχρις ότου χρησιμοποιηθούν.
3. Αναμειγνύεται το αραιωτικό διάλυμα προενισχυτή/ενισχυτή αναστρέφοντας πολλές φορές, μέχρις ότου γίνει ομοιογενές.
4. Παρασκευάζεται το αραιωτικό εργασίας προενισχυτή/ενισχυτή σε ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 50 mL. Χρησιμοποιείται ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15 mL, για μικρότερους όγκους. α) Προστίθεται ο όγκος που είναι κατάλληλος στον αριθμό ταινιών που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό. Προστίθεται θειϊκή δεξτράνη με χρήση πιπέτας θετικής μετατόπισης.

| <i>Ταινίες υποδοχών σύλληψης</i> | <i>Δείγματα</i> | <i>Αραιωτικό προενισχυτή/ ενισχυτή</i> | <i>Θειϊκή δεξτράνη</i> |
|----------------------------------|-----------------|--|------------------------|
| 8 | 84 | 21,0 mL | 7,0 mL |
| 6 | 60 | 18,0 mL | 6,0 mL |
| 5 | 48 | 15,0 mL | 5,0 mL |
| 4 | 36 | 12,0 mL | 4,0 mL |
| 3 | 24 | 9,0 mL | 3,0 mL |
| 2 | 12 | 6,0 mL | 2,0 mL |

β) Πωματίζεται το σωληνάριο, κατόπιν αναστρέφεται 10 φορές και περιδινείται επί 20 δευτερόλεπτα για να αναμειχθεί το περιεχόμενο. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία έως ότου το αραιωτικό αναμειχθεί εντελώς. Το αραιωτικό εργασίας ενδέχεται να είναι πολύ αφρώδες. Τοποθετείται σε υδατόλουτρο $37 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ και αφήνεται ο αφρός να διαλυθεί. Τοποθετούνται οι ανιχνευτές προενισχυτή επάνω στον πάγκο εργασίας και φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Παρασκευάζεται το αντιδραστήριο εργασίας προενισχυτή σε ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15 mL. α) Προστίθεται ο όγκος που είναι κατάλληλος στον αριθμό ταινιών που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό.

| <i>Ταινίες υποδοχών σύλληψης</i> | <i>Δείγματα</i> | <i>Αραιωτικό εργασίας προενισχυτή/ενισχυτή</i> | <i>Ανιχνευτές προενισχυτή</i> |
|---|------------------------|---|--|
| 8 | 84 | 13,0 mL | 100 μL |
| 6 | 60 | 9,8 mL | 75 μL |
| 5 | 48 | 8,4 mL | 65 μL |
| 4 | 36 | 7,2 mL | 55 μL |
| 3 | 24 | 5,1 mL | 39 μL |
| 2 | 12 | 3,9 mL | 30 μL |

β) Πωματίζεται το σωληνάριο, κατόπιν αναστρέφεται 10 φορές και περιδινείται επί 5 έως 20 δευτερόλεπτα για να αναμειχθεί το περιεχόμενο. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία έως ότου το αντιδραστήριο αναμειχθεί εντελώς. Τοποθετείται σε υδατόλουτρο $37 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ και αφήνεται ο αφρός να διαλυθεί.

6. Επώαζεται ολονύχτια. Η ολονύκτια επώαση δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 18 ώρες.
7. Μετά την εξαγωγή των πλακών, προστίθενται 100 μL αντιδραστηρίου εργασίας προενισχυτή σε κάθε κυψελίδα εντός 4 λεπτών. Να μην υπερβαίνονται τα 5 λεπτά.
8. Η επώαση διαρκεί 30 λεπτά και ακολουθείται από έναν κύκλο ψύξης/έκπλυσης. Παρασκευάζεται το αντιδραστήριο εργασίας ενισχυτή όταν αρχίσει ο κύκλος ψύξης/πλύσης.
9. Τοποθετείται ο ανιχνευτής ενισχυτή επάνω στον πάγκο εργασίας και αφήνεται να φθάσει σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Παρασκευάζεται το αντιδραστήριο εργασίας ενισχυτή σε ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15 mL. α) Προστίθεται ο όγκος που είναι κατάλληλος στον αριθμό ταινιών που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό.

| <i>Ταινίες υποδοχών σύλληψης</i> | <i>Δείγματα</i> | <i>Αραιωτικό εργασίας προενισχυτή/ενισχυτή</i> | <i>Ανιχνευτής ενισχυτή</i> |
|----------------------------------|-----------------|--|----------------------------|
| 8 | 84 | 13,0 mL | 100 µL |
| 6 | 60 | 9,8 mL | 75 µL |
| 5 | 48 | 8,4 mL | 65 µL |
| 4 | 36 | 7,2 mL | 55 µL |
| 3 | 24 | 5,1 mL | 39 µL |
| 2 | 12 | 3,9 mL | 30 µL |

β) Πωματίζεται το σωληνάριο, κατόπιν αναστρέφεται 10 φορές και περιδινείται επί 5 έως 20 δευτερόλεπτα για να αναμειχθεί το περιεχόμενο. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία έως ότου το αντιδραστήριο αναμειχθεί εντελώς. Τοποθετείται σε υδατόλουτρο $37 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ και αφήνεται ο αφρός να διαλυθεί. Απορρίπτεται εάν δε χρησιμοποιηθεί εντός 30 λεπτών.

11. Μετά την εξαγωγή των πλακών, προστίθενται αμέσως 100 µL αντιδραστηρίου εργασίας ενισχυτή σε κάθε υποδοχή.
12. Επωάζεται για 30 λεπτά και ακολουθείται από έναν κύκλο ψύξης/πλύσης.

Υβριδισμός του ανιχνευτή σήμανσης

1. Τοποθετείται το αραιωτικό σήμανσης σε υδατόλουτρο $37 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ επί 10 λεπτά τουλάχιστον. Αναμειγνύεται αναστρέφοντας τη φιάλη αρκετές φορές.
2. Αποψύχεται ο ανιχνευτής σήμανσης σε κρύο νερό (4°C έως 15°C) ακριβώς πριν από τη χρήση.
3. Όταν αρχίσει ο κύκλος ψύξης/έκπλυσης, παρασκευάζεται το αντιδραστήριο εργασίας σήμανσης σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15 mL. α) Προστίθεται ο όγκος που είναι κατάλληλος στον αριθμό ταινιών που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό.

| <i>Ταινίες υποδοχών σύλληψης</i> | <i>Δείγματα</i> | <i>Αραιωτικό λύσης</i> | <i>Ανιχνευτής σήμανσης</i> |
|----------------------------------|-----------------|------------------------|----------------------------|
| 8 | 84 | 12,0 mL | 100 µL |
| 6 | 60 | 9,0 mL | 75 µL |
| 5 | 48 | 7,5 mL | 63 µL |
| 4 | 36 | 6,0 mL | 50 µL |
| 3 | 24 | 5,0 mL | 41 µL |
| 2 | 12 | 3,6 mL | 30 µL |

β) Πωματίζεται το σωληνάριο και κατόπιν αναστρέφεται 10 φορές. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου και αφήνεται ο αφρός να διαλυθεί. Απορρίπτεται εάν δε χρησιμοποιηθεί εντός 30 λεπτών.

4. Μετά την εξαγωγή των πλακών, προστίθενται αμέσως 100 μL αντιδραστηρίου εργασίας σήμανσης σε κάθε υποδοχή.
5. Η επώαση διαρκεί 45 λεπτά και ακολουθείται από έναν κύκλο ψύξης/πλύσης.
6. Κατά την έναρξη της επώασης του ανιχνευτή σήμανσης, αφαιρούνται το υπόστρωμα και το βελτιωτικό υποστρώματος από το κουτί 1 και αφήνονται να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Μέτρηση της εξόδου φωτός

1. Όταν αρχίσει ο κύκλος πλύσης, παρασκευάζεται το αντιδραστήριο εργασίας υποστρώματος σε ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15 mL. α) Προστίθεται ο όγκος που είναι κατάλληλος στον αριθμό ταινιών που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό:

| <i>Ταινίες υποδοχών σύλληψης</i> | <i>Δείγματα</i> | <i>Υπόστρωμα</i> | <i>Βελτιωτικό υποστρώματος</i> |
|----------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------|
| 8 | 84 | 11,0 mL | 1,0 mL |
| 6 | 60 | 8,3 mL | 0,75 mL |
| 5 | 48 | 6,9 mL | 0,63 mL |
| 4 | 36 | 5,5 mL | 0,50 mL |
| 3 | 24 | 4,1 mL | 0,38 mL |
| 2 | 12 | 2,8 mL | 0,25 mL |

β) Πωματίζεται το σωληνάριο και αναστρέφεται 10 φορές για να αναμειχθεί. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτεται εάν δε χρησιμοποιηθεί εντός 30 λεπτών.

2. Μετά την εξαγωγή των πλακών, προστίθενται αμέσως 80 μL αντιδραστηρίου εργασίας υποστρώματος σε κάθε υποδοχή. Χρησιμοποιείται μια πολυκάναλη πιπέτα 12 καναλιών και πληρώνεται η πλάκα από τη σειρά A προς τη σειρά H.

Αναλυτής bDNA του συστήματος 340

▪ *Βαθμονόμηση του προσδιορισμού*

Αναλύονται τα πέντε πρότυπα του κιτ με κάθε προσδιορισμό με σκοπό τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου σε κάθε δείγμα.

▪ *Ποιοτικός έλεγχος*

Για την παρακολούθηση της απόδοσης του προσδιορισμού, πρέπει να περιλαμβάνονται τρία επίπεδα ελέγχου με κάθε προσδιορισμό.

Ο προσδιορισμός θεωρείται έγκυρος εάν παρουσιαστούν όλες οι ακόλουθες συνθήκες:

- ✓ Οι τιμές που προσδιορίζονται για τους θετικούς μάρτυρες του HCV είναι εντός του καθορισμένου εύρους τιμών.
- ✓ Οι μονάδες σχετικού φωτός (RLU) για τα πρότυπα είναι ο γεωμετρικός μέσος $RLU\ Std\ A > RLU\ Std\ B > RLU\ Std\ C > \text{γεωμετρικός μέσος } RLU\ Std\ D > \text{γεωμετρικός μέσος } RLU\ Std\ E$.
- ✓ Ο αρνητικός μάρτυρας του HCV έχει τιμή < 3200 αντίγραφα/mL.

▪ *Ερμηνεία των αποτελεσμάτων*

Η έξοδος δεδομένων από τον αναλυτή bDNA αναφέρεται ως μονάδες σχετικού φωτός (RLU). Το φως που εκπέμπεται είναι ευθέως ανάλογο προς τον αριθμό των αντιγράφων/mL (copies/mL) του RNA του HCV. Το λογισμικό διαχείρισης δεδομένων (DMS) του bDNA αναφέρει τα αποτελέσματα εξετάσεων σε αντίγραφα/mL και σε διεθνείς μονάδες (IU/mL) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.).

Για τη δημιουργία μοντέλου του λογαρίθμου των RLU ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του RNA του HCV, χρησιμοποιείται μια λογιστική καμπύλη 4 παραμέτρων.

Το DMS χρησιμοποιεί τις παρατηρούμενες RLU και τις συγκεντρώσεις των σημείων

καμπύλης των έξι προτύπων για τον προσδιορισμό της καμπύλης βέλτιστης προσαρμογής για τη γραφική παράσταση της πρότυπης καμπύλης και για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA του HCV για κάθε δείγμα μάρτυρα και ασθενούς. Η πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται από εννέα υποδοχές των προτύπων (από μία υποδοχή για τα πρότυπα Β και C, δύο υποδοχές για τα πρότυπα Α και D και τρεις υποδοχές για το πρότυπο Ε). Τα αποτελέσματα κάθε εκτέλεσης εκτυπώνονται σε μια αναφορά.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Ο προσδιορισμός αναφέρει τιμές μεταξύ 3200 αντιγράφων/mL και 40.000.000 αντιγράφων/mL.
2. Τα δείγματα που έχουν τιμές μικρότερες από 3200 αντίγραφα/mL ή μεγαλύτερες από 40.000.000 αντίγραφα/mL βρίσκονται εκτός του εύρους αναφοράς του προσδιορισμού και αναφέρονται με τιμές είτε μικρότερες από 3200 αντίγραφα/mL είτε μεγαλύτερες από 40.000.000 αντίγραφα/mL, αντίστοιχα.

▪ **Περιορισμοί**

Ο προσδιορισμός περιορίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA του ιού HCV στον ορό ή το πλάσμα ανθρώπου. Σε δείγματα με συνολικό επίπεδο πρωτεΐνης υψηλότερο 9 g/dL, η ποσοτικοποίηση του RNA του HCV ενδέχεται να είναι μειωμένη. Επίπεδα μη συζευγμένης χολερυθρίνης υψηλότερα από 10 mg/dL ενδέχεται να μειώσουν την ποσοτικοποίηση του RNA του HCV.

▪ **Τυποποίηση**

Ο προσδιορισμός αυτός είναι τυποποιημένος σε αντίγραφα/mL με χρήση ενός μεταγραφώματος RNA που προέρχεται από την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή και την περιοχή πυρήνα του γονιδιώματος του HCV ως αναφορά. Η ποσότητα του RNA στο πρότυπο προσδιορίζεται από τρεις ανεξάρτητες αναλυτικές μεθόδους. Η συσχέτιση μεταξύ αποτελεσμάτων σε IU/mL και αντιγράφων/mL προσδιορίστηκε με ποσοτικοποίηση του προτύπου HCV του Π.Ο.Υ. με χρήση του υλικού αναφοράς του μεταγραφώματος RNA.

1.3.β. Προσδιορισμός HCV RNA RT-QPCR

- **Σκοπός χρήσης**

Η τεχνική artus HCV RT-QPCR (QIAGEN, Γερμανία) που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα σύστημα πολλαπλασιασμού νουκλεϊνικών οξέων in vitro για τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA του HCV σε ανθρώπινο πλάσμα. Το διαγνωστικό αυτό κιτ εξέτασης χρησιμοποιεί την αντίστροφη μεταγραφή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR). Η εξέταση μπορεί να προσδιορίσει ποσοτικά RNA του HCV σε εύρος 65–1 x 10⁶ HCV IU/ml.

- **Περίληψη και επεξήγηση της εξέτασης**

Το βασικό Kit που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα σύστημα έτοιμο προς χρήση για την ανίχνευση του RNA του HCV μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Περιέχει αντιδραστήρια και ένζυμα για την αντίστροφη μεταγραφή, τον ειδικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος μεγέθους 240 bp, του γονιδιώματος του HCV καθώς και για την άμεση ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού σε κανάλι φθορισμού.

Πέραν αυτού περιέχει για την ανίχνευση μιας πιθανής αναστολής της PCR, ένα δεύτερο ετερόλογο σύστημα πολλαπλασιασμού. Αυτοανιχνεύεται ως πρότυπο εσωτερικού ελέγχου (IC) σε κανάλι φθορισμού.

Το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής RT-PCR δεν επηρεάζεται αρνητικά. Στο κιτ συμπεριλαμβάνονται εξωτερικά θετικά πρότυπα ελέγχου με τη βοήθεια των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί προσδιορισμός της ποσότητας του παθογόνου παράγοντα.

- **Αρχές προσδιορισμού**

Η διάγνωση παθογόνων οργανισμών με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος του παθογόνου παράγοντα. Στην αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου η ανίχνευση γίνεται με τη βοήθεια φθορίζουσων χρωστικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές είναι

συνήθως συνδεδεμένες σε ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι προσκολλώνται ειδικά στο προϊόν του πολλαπλασιασμού της PCR. Η μέτρηση των εντάσεων φθορισμού, κατά την εξέλιξη της real time PCR (που σημαίνει πραγματικού χρόνου), επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των προϊόντων, χωρίς να χρειάζεται να ανοιχθούν και πάλι τα σωληνάκια των δειγμάτων μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR.

- ***Αναλυτική ευαισθησία***

Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης του συστήματος βρέθηκε στις 0,19 IU/μl ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 0,19 IU/μl μπορούν να ανιχνευθούν με πιθανότητα 95%.

Η αναλυτική ευαισθησία, λαμβάνοντας υπόψη την απομόνωση, καθορίστηκε με μία πρότυπη σειρά αραιώσεων του “WHO International HCV RNA Standard” από 500 ως την ονομαστική τιμή 5 IU/ml του HCV σε κλινικά δείγματα πλάσματος. Το αναλυτικό όριο ανίχνευσης βρίσκεται κατά συνέπεια στις 33,6 IU/ml ($p = 0,05$). Αυτό σημαίνει ότι 33,6 IU/ml μπορούν να ανιχνευθούν με πιθανότητα 95%.

- ***Ειδικότητα***

Η ειδικότητα του συστήματος εξασφαλίζεται κατά κύριο λόγο με την επιλογή των εκκινητών και των ανιχνευτών καθώς και με την επιλογή αυστηρών συνθηκών αντίδρασης.

Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές έχουν ελεγχθεί με βάση την ανάλυση σύγκρισης αλληλουχίας, όσον αφορά τυχόν ομολογίες με άλλες αλληλουχίες αναφερόμενες σε τράπεζες γονιδίων.

Με αυτόν τον τρόπο έχει ελεγχθεί και η δυνατότητα ανίχνευσης των σχετικών υποτύπων και γονοτύπων. Καμμία διασταυρούμενη αντίδραση δεν εμφανίστηκε σε μικτές λοιμώξεις.

- *Αντιδραστήρια*

| |
|--|
| Αντιδραστήρια – εξοπλισμός |
| Κιτ απομόνωσης RNA |
| Πιπέτες (ρυθμιζόμενες) |
| Στείρα ρύγχη πιπετών με φίλτρο |
| Αναδευτήρας Vortex |
| Επιτραπέζια φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια 2 ml |
| Όργανο Rotor-Gene Q ή Rotor-Gene με κανάλια φθορισμού για Cycling Green και Cycling Orange ή με κανάλια φθορισμού για Cycling A.FAM και Cycling A.ROX |
| Rotor-Gene Q software version 1.7.94 (Rotor-Gene 6000 software version 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94: Rotor-Gene 3000 software version 6.0.23-QIAGEN, Γερμανία) |
| Σειρές σωληναρίων και καλυμμάτων, 0,1 ml, για τη χρήση με κεφαλή 72 υποδοχών |
| Προαιρετικά: Σωληνάρια PCR, 0,2 ml, for για τη χρήση με κεφαλή 36 υποδοχών |
| Μονάδα ψύξης (Loading Block 72 x 0,1 ml σωληναρίων ή Loading Block 96 x 0,2 ml σωληναρίων |

Διαδικασία προσδιορισμού

- *Απομόνωση RNA*

Η προσθήκη του φορέα RNA έχει μεγάλη σημασία για την αποτελεσματικότητα της απομόνωσης και επομένως για την απόδοση του DNA/RNA.

Το πρότυπο εσωτερικού ελέγχου μπορεί να εισαχθεί κατευθείαν στη διαδικασία απομόνωσης. Να επιβεβαιώνεται ότι στη διαδικασία αυτή, είναι απαραίτητο να περιλαμβάνεται ένα αρνητικό δείγμα πλάσματος. Το σήμα του εντός αυτού περιεχομένου προτύπου εσωτερικού ελέγχου αποτελεί τη βάση για την αξιολόγηση της απομόνωσης.

- *Πρότυπο εσωτερικού ελέγχου*

Το πρότυπο εσωτερικού ελέγχου που περιλαμβάνεται στο κιτ, δίνει τη δυνατότητα να ελεγχθεί, τόσο η απομόνωση του RNA, όσο και μία ενδεχομένη αναστολή της PCR. Για την εφαρμογή αυτή, προστίθεται το πρότυπο εσωτερικού ελέγχου στη διαδικασία απομόνωσης σε αναλογία 0,1 ml ανά 1 ml όγκου διαλύματος έκλυσης. Το πρότυπο εσωτερικού ελέγχου και ο φορέας RNA επιτρέπεται να προστεθούν μόνο στο μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και υλικού δείγματος ή κατευθείαν στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Το πρότυπο εσωτερικού ελέγχου δεν επιτρέπεται να προστεθεί απευθείας στο υλικό δείγματος. Κατά την προσθήκη

στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης λαμβάνεται υπόψη ότι το μίγμα προτύπου εσωτερικού ελέγχου και ρυθμιστικού διαλύματος λύσης/φορέα RNA πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του (αποθήκευση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ψυγείο μπορεί να οδηγήσει, μετά από μερικές ώρες, σε απώλεια του προτύπου εσωτερικού ελέγχου και μείωση της αποτελεσματικότητας της απομόνωσης).

▪ **Ποσοτικοποίηση**

Τα παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης (βαθμονομητές) χρησιμοποιούνται όπως τα δείγματα που έχουν ήδη υποστεί καθαρισμό και εισάγονται στον ίδιο όγκο (20 μl). Για τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης στα όργανα, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και τα τέσσερα παρεχόμενα πρότυπα ποσοτικοποίησης.

Τα πρότυπα ποσοτικοποίησης ορίζονται ως IU/μl. Για τη μετατροπή των τιμών που έχουν καθοριστεί με βάση την πρότυπη καμπύλη σε IU/ml υλικού δείγματος πρέπει να εφαρμόζεται ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{Αποτέλεσμα (IU/ml)} = \frac{\text{Αποτέλεσμα IU/}\mu\text{l} \times \text{Όγκος έκλουσης (}\mu\text{l)}}{\text{Όγκος δείγματος (ml)}}$$

Στον παραπάνω αναφερόμενο τύπο, κατά κανόνα, τοποθετείται ο αρχικός όγκος δείγματος. Αυτό λαμβάνεται υπόψη όταν ο όγκος δείγματος μεταβάλλεται πριν την εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων (π.χ. μείωση λόγω φυγοκέντρωσης ή αύξηση λόγω συμπληρώματος για τον απαιτούμενο όγκο προς απομόνωση).

Πρωτόκολλο: PCR και Αξιολόγηση

▪ **Εκτέλεση**

1. Τοποθετείται ο αριθμός σωληναρίων PCR στις υποδοχές της μονάδας ψύξης.
2. Εάν χρησιμοποιείται το εσωτερικό πρότυπο ελέγχου για την επιτήρηση της διαδικασίας απομόνωσης του RNA και τον έλεγχο πιθανής αναστολής της

PCR, ακολουθείται το βήμα 2α. Εάν χρησιμοποιείται το εσωτερικό πρότυπο ελέγχου επιλεκτικά για τον έλεγχο αναστολής της PCR, ακολουθείται το βήμα 2β.

2α) Το εσωτερικό πρότυπο ελέγχου έχει ήδη προστεθεί στο στάδιο της απομόνωσης. Στην περίπτωση αυτή ετοιμάζεται ένα master mix. Το μίγμα αντίδρασης περιέχει τυπικά όλα τα συστατικά που χρειάζονται για την PCR εκτός από το δείγμα. 2β) Το εσωτερικό πρότυπο ελέγχου πρέπει να προστεθεί απευθείας στο μίγμα του Master A και Master B. Στην περίπτωση αυτή ετοιμάζεται ένα master mix. Το μίγμα αντίδρασης περιέχει τυπικά όλα τα συστατικά που χρειάζονται για την PCR εκτός από το δείγμα.

3. Εισάγεται με πιπέτα σε κάθε σωληνάριο PCR 30 μl του master mix. Στη συνέχεια εισάγονται 20 μl από το εκλούμενο RNA. Αντίστοιχα πρέπει να προστεθούν ως θετικό πρότυπο ελέγχου 20 μl από ένα τουλάχιστον πρότυπο ποσοτικοποίησης και ως αρνητικό πρότυπο ελέγχου 20 μl νερό (Water, PCR grade).
4. Κλείνονται τα σωληνάρια PCR. Λαμβάνεται υπόψη ότι στην κεφαλή θα πρέπει να τοποθετείται ένας δακτύλιος ασφάλειας για να εμποδίζεται το τυχαίο άνοιγμα των σωληναρίων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.
5. Για την ανίχνευση του RNA του HCV πρέπει να δημιουργηθεί ένα συγκεκριμένο προφίλ θερμοκρασίας.

▪ **Ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

| | |
|-----------------------------|--|
| HCV RNA >34 IU/ml | Το αποτέλεσμα ευρίσκεται εντός των καθορισμένων ορίων του τεστ. Η πιθανότητα ανίχνευσης του RNA του HCV είναι > 95%. Το θετικό αποτέλεσμα του τεστ είναι στατιστικά διασφαλισμένο. |
| HCV RNA <34 IU/ml | Το αποτέλεσμα ευρίσκεται εκτός των καθορισμένων ορίων του τεστ. Η αναπαραγωγή του θετικού αποτελέσματος δεν είναι σίγουρη. |
| HCV RNA αρνητικό | Δεν ανιχνεύθηκε RNA του HCV. |

1.4. Στατιστική μέθοδος επεξεργασίας

Για την στατιστική ανάλυση και αξιολόγηση της βάσης δεδομένων που δημιουργήθηκε από τα άτομα που προσήλθαν στην Κλινική Σεξουαλικά Μεταδομένων Νοσημάτων & AIDS, κατά την χρονική περίοδο από το 2004 έως και το 2012 χρησιμοποιήθηκε το Λογισμικό “Stata/Special Edition 12.0”

Πρόκειται για δοκιμασία ανεξαρτησίας σε πίνακες συνάφειας με χρήση του συντελεστή X^2 του Pearson, ο οποίος χρησιμοποιείται για παρατηρήσεις ποιοτικών μεταβλητών. Η μηδενική υπόθεση που δοκιμάζεται είναι:

H_0 : Τα χαρακτηριστικά και του πληθυσμού είναι ανεξάρτητα με εναλλακτική.

H_1 : Τα χαρακτηριστικά και του πληθυσμού δεν είναι ανεξάρτητα.

Υποθέτουμε ότι υπάρχουν r κατηγορίες A_1, A_2, \dots, A_r για το χαρακτηριστικό A και c κατηγορίες B_1, B_2, \dots, B_c για το χαρακτηριστικό B , έτσι ώστε να υπάρχουν συνολικά $r*c$ κατηγορίες (κελιά). Το πλήθος των παρατηρήσεων του δείγματος που ανήκει στην κατηγορία A_i και στην κατηγορία B_j συμβολίζεται με f_{ij}^o .

Η πινακοποίηση αυτή καλείται $r*c$ πίνακας συνάφειας (contingency table). Συμβολίζουμε επίσης με $f_{1x}^o, f_{2x}^o, \dots, f_{rx}^o$ τα αθροίσματα των γραμμών και με $f_{x1}^o, f_{x2}^o, \dots, f_{xr}^o$ τα αθροίσματα των στηλών του πίνακα.

Για να δοκιμάσουμε την ανεξαρτησία των δύο χαρακτηριστικών, θα πρέπει πρώτα να υπολογίσουμε τον πίνακα των αναμενόμενων συχνοτήτων κάτω από την μηδενική υπόθεση. Στη συνέχεια υπολογίζουμε το στατιστικό Pearson X^2 με βάση τις παρατηρούμενες (*observed*) και αναμενόμενες (*expected*) συχνότητες από κάθε κελί.

Κάτω από την H_0 για το ότι τα χαρακτηριστικά A και B και είναι ανεξάρτητα, ισχύει:

$$P(A_i \cap B_j) = P(A_i) * P(B_j) \quad (1)$$

Επειδή τα $P(A_i)$ και $P(B_j)$ είναι άγνωστα μπορούν να εκτιμηθούν από το δείγμα:

$$P(A_i) = f_{ix}^o / N \text{ και } P(B_j) = f_{xj}^o / N$$

Τότε η αναμενόμενη συχνότητα των παρατηρήσεων στο κελί (A_i, B_j) είναι το γινόμενο της από κοινού πιθανότητας (1) επί το μέγεθος του δείγματος:

$$f_{ij}^e = P(A_i) * P(B_j) * N = (f_{ix}^o * f_{xj}^o) / N \quad (2)$$

Ο τύπος για το στατιστικό X^2 του Pearson είναι:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(f_{ij}^o - f_{ij}^e)^2}{f_{ij}^e} \quad (3) \quad \text{που έχει } (r-1)(c-1) \text{ βαθμούς ελευθερίας.}$$

Αφού υπολογιστεί, το στατιστικό ακολουθεί την κατανομή $X^2(r-1)(c-1)$. Για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ από κατάλληλους πίνακες ή με την βοήθεια υπολογιστικού προγράμματος βρίσκουμε την θεωρητική τιμή $X^2(r-1)(c-1)_{0,05} = Y$. Τελικά συγκρίνουμε την εκτιμηθείσα με την θεωρητική τιμή X^2 και:

- ✓ αν $X^2(r-1)(c-1) > X^2(r-1)(c-1)_{0,05}$ τότε δεν αποδεχόμαστε την H_0 , ενώ
- ✓ αν $X^2(r-1)(c-1) < X^2(r-1)(c-1)_{0,05}$ τότε αποδεχόμαστε την H_0 .

Εναλλακτικά, τα στατιστικά προγράμματα δίνουν την τιμή p-value την οποία συγκρίνουμε κάθε φορά με το κατάλληλο α (εδώ $\alpha=0,05$) και:

- ✓ αν **p-value** < **a** τότε δεν αποδεχόμαστε την H_0 , ενώ
- ✓ αν **p-value** > **a** τότε αποδεχόμαστε την H_0

Συνοπτικά, ο ερευνητής προβαίνει σε διαρκείς συγκρίσεις της εκάστοτε εκτιμηθείσας τιμής X^2 με την αντίστοιχη θεωρητική τιμή X^2 όπως αυτή ανευρίσκεται σε σταθερούς στατιστικούς πίνακες και αποφαινεται για το κατά πόσο διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους αυτές οι τιμές. Εάν δεν υπάρχει διαφορά, τότε οι μεταβλητές είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους, ενώ εάν υπάρχει, τότε υπάρχει εξάρτηση.

Εναλλακτικά, γίνεται εκτίμηση της τιμής p-value (πρακτικά είναι μία μαθηματική μετατροπή της διαφοράς των δύο ανωτέρω X^2 σε κλίμακα πιο εύκολα αναγνωρίσιμη από τον ερευνητή) όπου συγκρίνεται η εκάστοτε υπολογισθείσα τιμή p-value με μία σταθερή τιμή α (συνήθως 0,05) και αν p-value < α τότε δεν είναι ανεξάρτητα τα μελετώμενα χαρακτηριστικά, ενώ αν η p-value > α τότε αποδεχόμαστε την ανεξαρτησία των μεταβλητών.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1. Εισαγωγή

Το σύνολο των ασθενών που προσήλθαν στην Κλινική Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων & AIDS, κατά την χρονική περίοδο από το 2004 έως και το 2012 και επιλέχθηκαν προς μελέτη ανέρχεται στους 1.543. Ωστόσο, λόγω ελλειπών στοιχείων, σε μερικές καταγραφές, οι πλήρεις καταχωρήσεις ανέρχονται στις 1.252.

Οι μελετούμενες **δημογραφικές και επιδημιολογικές** μεταβλήτες-στοιχεία είναι:

- η Χρήση Τοξικών Ουσιών,
- η συνύπαρξη HCV με άλλα Σεξουαλικά Μεταδιδόμενα Νοσήματα - ΣΜΝ (*Sexually Transmitted Diseases-STD*),
- η Ηλικία,
- το Φύλο,
- το Μορφωτικό Επίπεδο (Γραμματικές Γνώσεις),
- η Καταγωγή,
- ο Σεξουαλικός Προσανατολισμός,
- ο Αριθμός Συντρόφων το τελευταίο 6μηνο,
- η Χρήση Προφυλακτικού, και
- η παράμετρος “Οικονομικός Πρόσφυγας”.

Στο πλαίσιο της περιγραφικής στατιστικής και επιδημιολογίας παρατίθενται τα περιγραφικά χαρακτηριστικά των ποικίλων δημογραφικών και εργαστηριακών παραμέτρων, οι οποίες επιλέχθηκαν προς μελέτη, καθώς και οι έλεγχοι ανεξαρτησίας της μικτής μεταβλητής [HCV+ΣΜΝ] με κάθε άλλη μεταβλητή.

2.2. Ιστογράμματα ποσοστιαίας κατανομής ανά κατηγορία

2.2.α. Ποσοστιαία Κατανομή Χρήσης Τοξικών Ουσιών

Η μεταβλητή «Χρήση Τοξικών Ουσιών» αποτελεί ποιοτική κατηγορική μεταβλητή (*nominal*). Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι ασθενείς ως προς την Χρήση Τοξικών Ουσιών είναι οι παρακάτω:

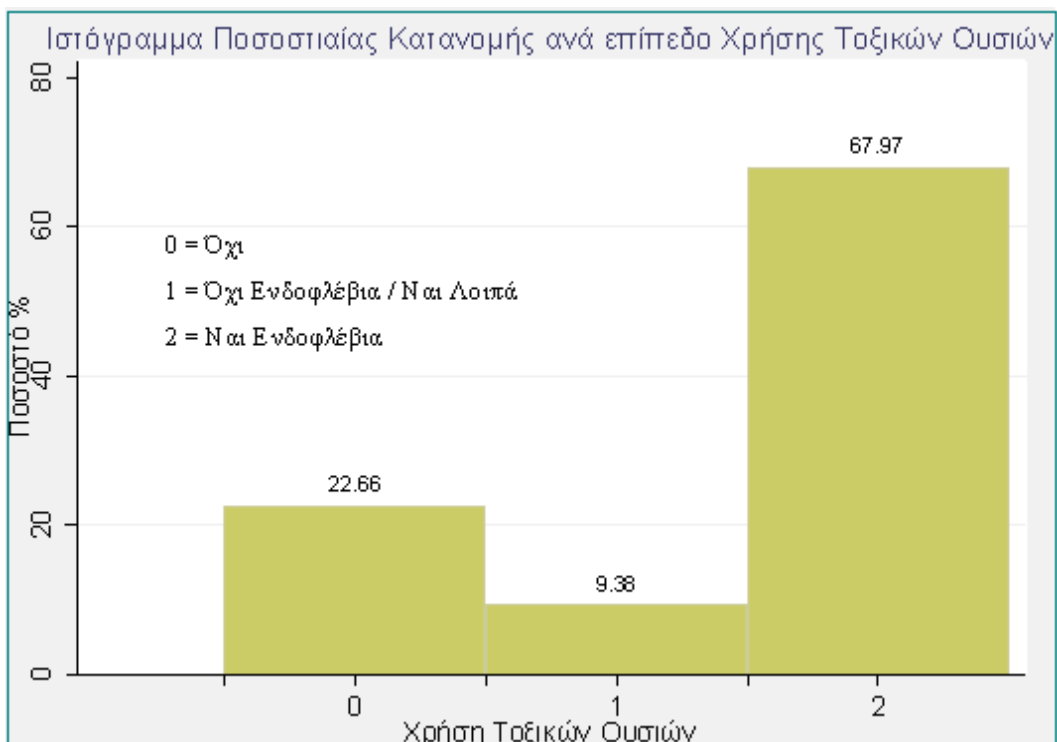
0 = Όχι

1 = Όχι Ενδοφλέβια / Ναι Λοιπά

2 = Ναι Ενδοφλέβια

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που έχουμε με πλήρη στοιχεία για την Χρήση Τοξικών Ουσιών είναι 1.258 και οι συχνότητες, τα ποσοστά εμφάνισης και οι αθροιστικές συχνότητες τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ενώ το ιστόγραμμα που ακολουθεί αποτελεί τη γραφική απεικόνιση αυτών.

| Χρήση τοξικών ουσιών | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|-----------------------------|------------------|----------------|-------------------------|
| Όχι | 285 | 22.66 | 22.66 |
| Όχι Ενδοφλέβια / Ναι Λοιπά | 118 | 9.38 | 32.03 |
| Ναι Ενδοφλέβια | 855 | 67.97 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,258 | 100.00 | |



Ο κύριος όγκος των χρηστών τοξικών ουσιών ανέρχεται στο 77,35% του δείγματός μας, όπως αναμενόταν από την γνώση της διεθνούς επιδημιολογίας της νόσου.

2.2.β. Ποσοστιαία κατανομή ανά ΣΜΝ

Η μεταβλητή «ΣΜΝ» αποτελεί ποιοτική κατηγορική μεταβλητή (*nominal*²). Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι ασθενείς ως προς την συνύπαρξη HCV με ένα άλλο ΣΜΝ είναι οι παρακάτω:

0 = HCV

1 = HCV + HBV

2 = HCV + HIV

3 = HCV + Σύφιλη

4 = HCV + HIV + Σύφιλη

² Στην ονομαστική κλίμακα (Nominal) η μεταβλητή σχετίζεται με κατηγορία

5 = HCV + HBV + HIV

6 = HCV + HBV + Σύφιλη

7 = HCV + HBV + HIV + Σύφιλη

8 = HCV + HBV + Άλλο

9 = HCV + Σύφιλη + Άλλο

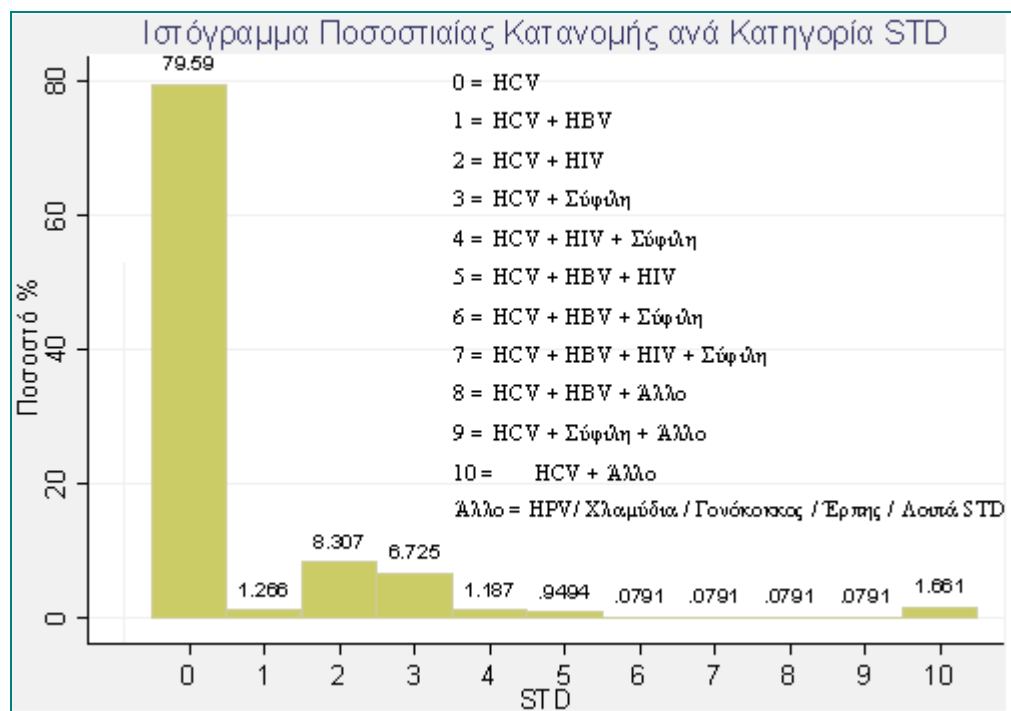
10 = HCV + Άλλο

όπου:

Άλλο = HPV/ Χλαμύδια / Γονόκοκκος / Έρπης / Λοιπά ΣΜΝ

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που διατίθενται με πλήρη στοιχεία για τα ΣΜΝ είναι 1264 και οι συχνότητες, τα ποσοστά εμφάνισης και οι αθροιστικές συχνότητες τους παρουσιάζονται με φθίνουσα σειρά στον παρακάτω πίνακα, ενώ το ιστόγραμμα που ακολουθεί αποτελεί τη γραφική απεικόνιση αυτών.

| STD | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|--------------------|------------------|----------------|-------------------------|
| HCV | 1,006 | 79.59 | 79.59 |
| HCV+HIV | 105 | 8.31 | 87.90 |
| HCV+Σύφιλη | 85 | 6.72 | 94.62 |
| HCV+Άλλο | 21 | 1.66 | 96.28 |
| HCV+HBV | 16 | 1.27 | 97.55 |
| HCV+HIV+Σύφιλη | 15 | 1.19 | 98.73 |
| HCV+HBV+HIV | 12 | 0.95 | 99.68 |
| HCV+HBV+Σύφιλη | 1 | 0.08 | 99.76 |
| HCV+HBV+HIV+Σύφιλη | 1 | 0.08 | 99.84 |
| HCV+HBV+Άλλο | 1 | 0.08 | 99.92 |
| HCV+Σύφιλη+Άλλο | 1 | 0.08 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,264 | 100.00 | |



Οι HCV θετικοί ασθενείς εμφανίζουν συνύπαρξη με άλλο ΣΜΝ σε αναλογία 20,41%.

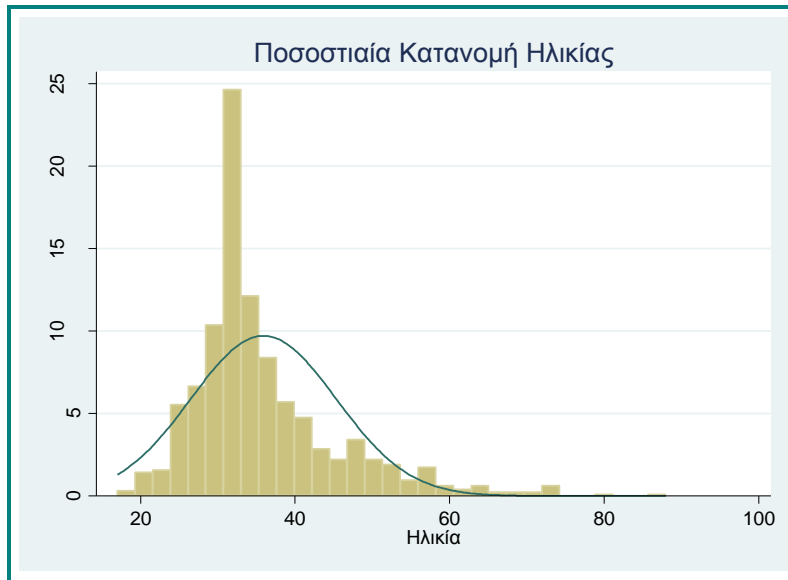
Συχνότερο ΣΜΝ στον μελετώμενο πληθυσμό είναι ο HIV που εμφανίζεται σε συνολικά 133 ασθενείς, ποσοστό 10,5%.

2.2.γ. Ποσοστιαία κατανομή ανά Ηλικία

Η μεταβλητή «Ηλικία» αποτελεί ποσοτική διακριτή μεταβλητή (*discrete*) δυνάμενη να χαρακτηριστεί όμως ως ποσοτική συνεχής (*continuous*). Τα περιγραφικά χαρακτηριστικά της παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα.

| Μεταβλητή | Παρατηρήσεις | Μέση τιμή | Τυπική απόκλιση | Ελάχιστη τιμή | Μέγιστη τιμή |
|---------------|--------------|-----------|-----------------|---------------|--------------|
| Ηλικία | 1262 | 35.90808 | 9.411356 | 17 | 88 |

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που διατίθενται για την Ηλικία είναι 1.262 με μέση ηλικία τα 35,9±9,4 έτη και εύρος τιμών 17 έως 88 έτη. Η γραφική απεικόνιση αυτών δίδεται με το ακόλουθο ιστόγραμμα.



Εφαρμόζεται, επίσης, έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk που διατυπώνεται ως εξής:

- ✓ H_0 : Ισχύει η «κανονικότητα» της υπό μελέτης μεταβλητής
- ✓ H_1 : Δεν ισχύει η «κανονικότητα» της υπό μελέτης μεταβλητής.

| Έλεγχος κανονικότητας κατά Shapiro-Wilk W | | | | | |
|--|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Μεταβλητή | Παρατηρήσεις | Έλεγχος W | Έλεγχος V | Έλεγχος Z | Prob>z |
| Ηλικία | 1262 | 0.88312 | 91.131 | 11.279 | 0.00000 |

Επειδή η τιμή p-value είναι $<0,001 < 0,05$ η μεταβλητή **Ηλικία** δεν ακολουθεί κανονική κατανομή γεγονός που ήταν εμφανές και από το διάγραμμα κατανομής.

2.2.δ. Ποσοστιαία κατανομή ανά Φύλο

Η μεταβλητή «Φύλο» αποτελεί ποιοτική κατηγορική μεταβλητή (*nominal*). Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι ασθενείς ως προς το Φύλο είναι οι παρακάτω:

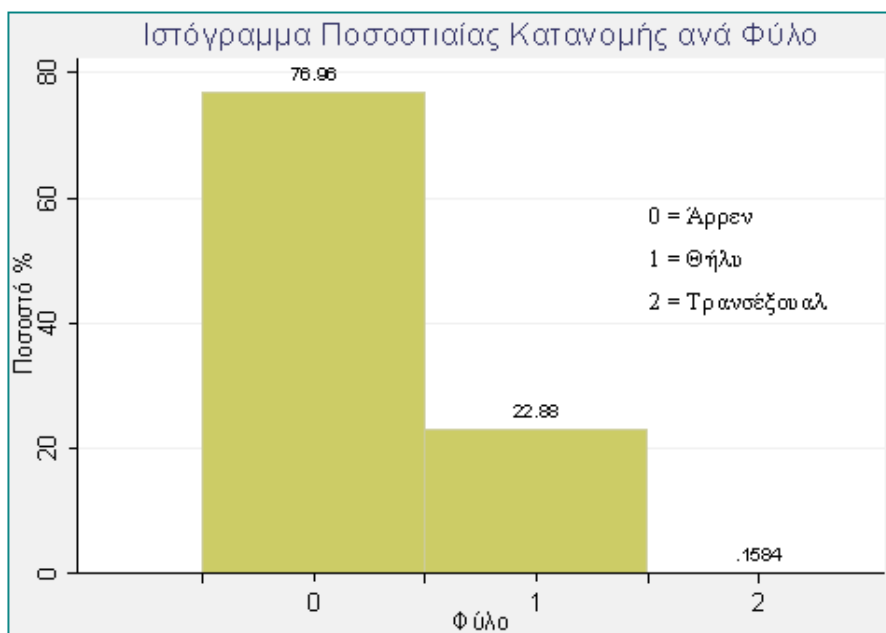
0 = Άρρεν

1 = Θήλυ

2 = Τρανσέξουαλ

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που διατίθενται με πλήρη στοιχεία για το Φύλο είναι 1.263 και οι συχνότητες, τα ποσοστά εμφάνισης και οι αθροιστικές συχνότητες τους παρουσιάζονται με φθίνουσα σειρά στον παρακάτω πίνακα, ενώ το ιστόγραμμα που ακολουθεί αποτελεί τη γραφική απεικόνιση αυτών.

| Φύλο | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|---------------|------------------|----------------|-------------------------|
| Άρρεν | 972 | 76.96 | 76.96 |
| Θήλυ | 289 | 22.88 | 99.84 |
| Τρανσέξουαλ | 2 | 0.16 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,263 | 100.00 | |



Οι ασθενείς του δείγματος είναι κατά κύριο λόγο άρρενες (76,96%).

2.2.ε. Ποσοστιαία κατανομή ανά Μορφωτικό Επίπεδο

Η μεταβλητή μορφωτικού επιπέδου («Γραμματικές Γνώσεις») αποτελεί ποιοτική διατάξιμη μεταβλητή (*ordinal*). Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι ασθενείς ως προς το επίπεδο των Γραμματικών Γνώσεών τους είναι οι παρακάτω, με μικρότερο επίπεδο

γραμματικών γνώσεων τους αναλφάβητους και μέγιστο τους έχοντες μεταπτυχιακού επιπέδου εκπαίδευση:

0 = Αναλφάβητος

1 = Δημοτικό

2 = Γυμνάσιο

3 = Λύκειο

4 = ΙΕΚ

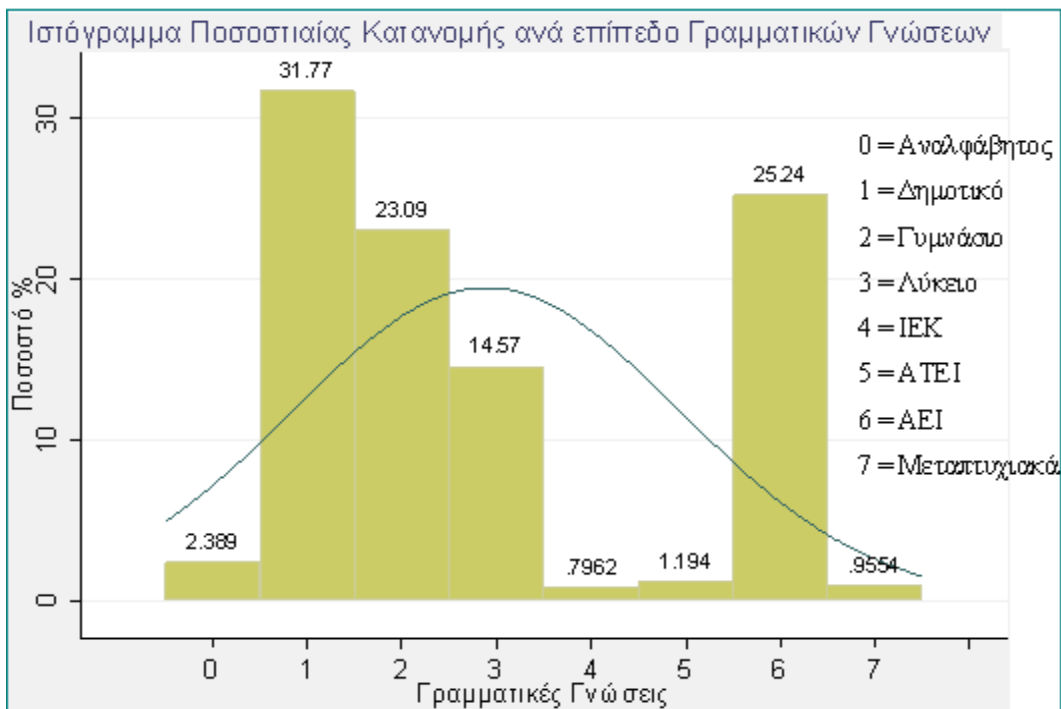
5 = ΑΤΕΙ

6 = ΑΕΙ

7 = Μεταπτυχιακά

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που διατίθενται με πλήρη στοιχεία για τις Γραμματικές Γνώσεις είναι 1.256 και οι συχνότητες, τα ποσοστά εμφάνισης και οι αθροιστικές συχνότητες τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ενώ το ιστόγραμμα που ακολουθεί αποτελεί τη γραφική απεικόνιση αυτών.

| Γραμματικές Γνώσεις | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|--------------------------------|------------------|----------------|-------------------------|
| Αναλφάβητος | 30 | 2.39 | 2.39 |
| Δημοτικό | 399 | 31.77 | 34.16 |
| Γυμνάσιο | 290 | 23.09 | 57.25 |
| Λύκειο | 183 | 14.57 | 71.82 |
| ΙΕΚ | 10 | 0.80 | 72.61 |
| ΑΤΕΙ | 15 | 1.19 | 73.81 |
| ΑΕΙ | 317 | 25.24 | 99.04 |
| Μεταπτυχιακά | 12 | 0.96 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,256 | 100.00 | |



Οι ομάδες που εμφανίζονται συχνότερα όσον αφορά το μορφωτικό επίπεδο στο δείγμα μας, είναι Στοιχειώδους Εκπαίδευσης (31,77%) και Ανώτατης Εκπαίδευσης (26,20%).

Το γεγονός ότι η μεταβλητή Γραμματικές Γνώσεις είναι διατάξιμη μας δίνει τη δυνατότητα να κάνουμε και κάποιες εκτιμήσεις σχετικά με το επίπεδο Γραμματικών Γνώσεων του μέσου ασθενή του δείγματός μας.

Έτσι, συνοπτικώς, παρατηρούμε ότι η μέση παρατήρηση στο δείγμα μας είναι στο 2,89 → 3 που αντιστοιχεί σε επίπεδο Γραμματικών Γνώσεων αποφοίτου Λυκείου:

| Μεταβλητή | Παρατηρήσεις | Μέση τιμή | Τυπική απόκλιση | Ελάχιστη τιμή | Μέγιστη τιμή |
|----------------------------|--------------|-----------|-----------------|---------------|--------------|
| Γραμματικές Γνώσεις | 1256 | 2.889331 | 2.046397 | 0 | 7 |

Εφαρμόζεται, επίσης, έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk που διατυπώνεται ως εξής:

- ✓ H_0 : Ισχύει η «κανονικότητα» της υπό μελέτης μεταβλητής.
- ✓ H_1 : Δεν ισχύει η «κανονικότητα» της υπό μελέτης μεταβλητής.

| Έλεγχος κανονικότητας κατά Shapiro-Wilk W | | | | | |
|---|--------------|-----------|-----------|-----------|---------|
| Μεταβλητή | Παρατηρήσεις | Έλεγχος W | Έλεγχος V | Έλεγχος Z | Prob>z |
| Γραμματικές Γνώσεις | 1256 | 0.89530 | 81.275 | 10.991 | 0.00000 |

Η τιμή p-value είναι $<0,001 < 0,05$ άρα η μεταβλητή Μορφωτικό Επίπεδο δεν ακολουθεί κανονική κατανομή, γεγονός που είναι εμφανές και από το διάγραμμα κατανομής.

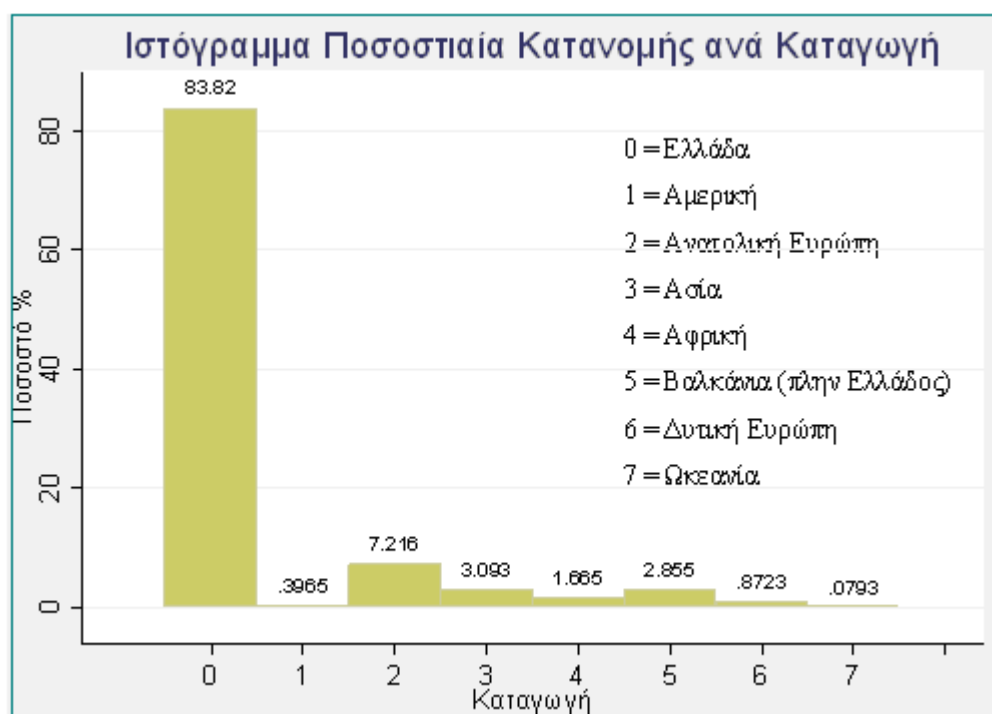
2.2.ζ. Ποσοστιαία κατανομή ανά Καταγωγή

Η μεταβλητή «Καταγωγή» αποτελεί ποιοτική κατηγορική μεταβλητή (*nominal*). Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι ασθενείς ως προς την Καταγωγή τους είναι οι παρακάτω:

- 0 = Ελλάδα
- 1 = Αμερική
- 2 = Ανατολική Ευρώπη
- 3 = Ασία
- 4 = Αφρική
- 5 = Βαλκάνια (πλην Ελλάδος)
- 6 = Δυτική Ευρώπη
- 7 = Ωκεανία

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που έχουμε με πλήρη στοιχεία για την Καταγωγή είναι 1.261 και οι συχνότητες, τα ποσοστά εμφάνισης και οι αθροιστικές συχνότητες τους παρουσιάζονται με φθίνουσα σειρά στον παρακάτω πίνακα, ενώ το ιστόγραμμα που ακολουθεί αποτελεί τη γραφική απεικόνιση αυτών.

| Καταγωγή | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|------------------|------------------|----------------|-------------------------|
| Ελλάδα | 1,057 | 83.82 | 83.82 |
| Ανατολική Ευρώπη | 91 | 7.22 | 91.04 |
| Ασία | 39 | 3.09 | 94.13 |
| Βαλκάνια | 36 | 2.85 | 96.99 |
| Αφρική | 21 | 1.67 | 98.65 |
| Δυτική Ευρώπη | 11 | 0.87 | 99.52 |
| Αμερική | 5 | 0.40 | 99.92 |
| Ωκεανία | 1 | 0.08 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,261 | 100.00 | |



Ο κύριος όγκος των ασθενών είναι Ελληνικής καταγωγής με ποσοστό 83,82%.

2.2.η. Ποσοστιαία κατανομή ανά Σεξουαλικό Προσανατολισμό

Η μεταβλητή «Σεξουαλικός Προσανατολισμός» αποτελεί ποιοτική κατηγορική μεταβλητή (*nominal*). Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι ασθενείς ως προς τον Σεξουαλικό Προσανατολισμό τους είναι οι παρακάτω:

0 = Ετεροφυλόφιλοι

1 = Ομοφυλόφιλοι

2 = Αμφιφυλόφιλοι

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που έχουμε με πλήρη στοιχεία για τον Σεξουαλικό Προσανατολισμό είναι 1.261 και οι συχνότητες, τα ποσοστά εμφάνισης και οι αθροιστικές συχνότητες τους παρουσιάζονται με φθίνουσα σειρά στον παρακάτω πίνακα, ενώ το ιστόγραμμα που ακολουθεί αποτελεί τη γραφική απεικόνιση αυτών.

| Σεξουαλικός Προσανατολισμός | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|------------------------------------|------------------|----------------|-------------------------|
| Ετεροφυλόφιλοι | 1,167 | 92.55 | 92.55 |
| Ομοφυλόφιλοι | 82 | 6.50 | 99.05 |
| Αμφιφυλόφιλοι | 12 | 0.95 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,261 | 100.00 | |



Οι ασθενείς του δείγματος είναι κατά κύριο λόγο ετεροφυλόφιλοι (92,5%).

2.2.θ. Ποσοστιαία κατανομή ανά Αριθμό Συντρόφων το τελευταίο εξάμηνο

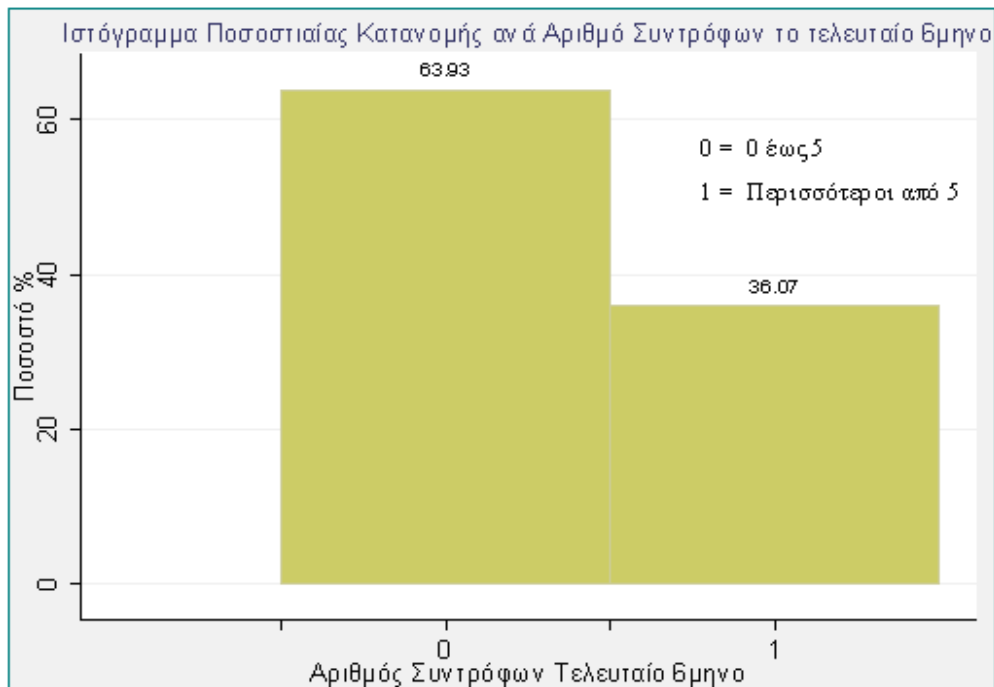
Η μεταβλητή «Αριθμός Συντρόφων το τελευταίο 6μηνο» αποτελεί ποιοτική κατηγορική μεταβλητή (*nominal*). Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι ασθενείς ως προς τον Αριθμό Συντρόφων τους το τελευταίο 6μηνο είναι οι παρακάτω:

0 = 0 έως 5

1 = Περισσότεροι από 5

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που έχουμε με πλήρη στοιχεία για τον Αριθμό Συντρόφων το τελευταίο 6μηνο είναι 1.256 και οι συχνότητες, τα ποσοστά εμφάνισης και οι αθροιστικές συχνότητες τους παρουσιάζονται με φθίνουσα σειρά στον παρακάτω πίνακα, ενώ το ιστόγραμμα που ακολουθεί αποτελεί τη γραφική απεικόνιση αυτών.

| Αριθμός συντρόφων το τελευταίο 6 μήνο | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|--|------------------|----------------|-------------------------|
| 0-5 | 803 | 63.93 | 63.93 |
| >5 | 453 | 36.07 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,256 | 100.00 | |



Στην κατηγορία αυτή, αν και με μεγαλύτερη συχνότητα (63,93%) εμφανίζονται οι έχοντες λιγότερο των 5 συντρόφων ανά εξάμηνο, παρατηρείται πολύ μεγάλη αναλογία ασθενών (36,07%) με περισσότερους των 5 συντρόφων ανά εξάμηνο.

2.2.1. Ποσοστιαία κατανομή Χρήσης Προφυλακτικού

Η μεταβλητή «Χρήση Προφυλακτικού» αποτελεί ποιοτική κατηγορική μεταβλητή (nominal). Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι ασθενείς ως προς τη Χρήση Προφυλακτικού είναι οι παρακάτω:

0 = Όχι

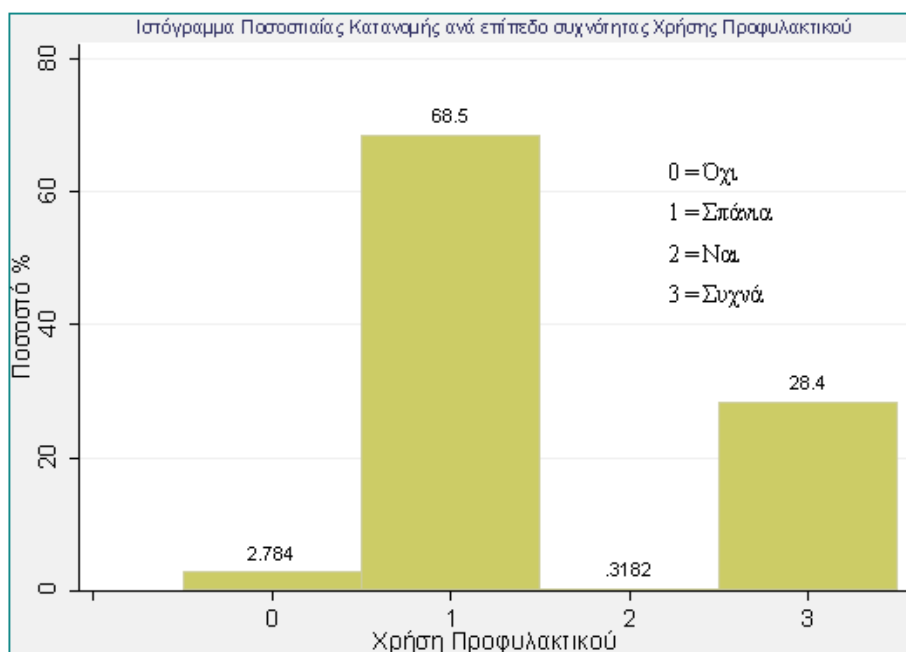
1 = Σπάνια

2 = Ναι

3 = Συχνά

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που έχουμε με πλήρη στοιχεία για τη Χρήση Προφυλακτικού είναι 1.257 και οι συχνότητες, τα ποσοστά εμφάνισης και οι αθροιστικές συχνότητες τους παρουσιάζονται με φθίνουσα σειρά στον παρακάτω πίνακα, ενώ το ιστόγραμμα που ακολουθεί αποτελεί τη γραφική απεικόνιση αυτών.

| Χρήση προφυλακτικού | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|----------------------------|------------------|----------------|-------------------------|
| Σπάνια | 861 | 68.50 | 68.50 |
| Συχνά | 357 | 28.40 | 96.90 |
| Όχι | 35 | 2.78 | 99.68 |
| Ναι | 4 | 0.32 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,257 | 100.00 | |



Η σταθερή και συνεπής χρήση προφυλακτικού είναι σπανιότατη στο δείγμα, γεγονός που συνάδει με την ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών και τη συχνή εναλλαγή συντρόφων.

2.2.κ. Ποσοστιαία κατανομή μεταβλητής Οικονομικός Πρόσφυγας

Η μεταβλητή «Οικονομικός Πρόσφυγας» αποτελεί ποιοτική κατηγορική μεταβλητή (*nominal*). Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν οι ασθενείς ως προς την κατάσταση τους σχετικά με το αν είναι Οικονομικοί Πρόσφυγες είναι οι παρακάτω:

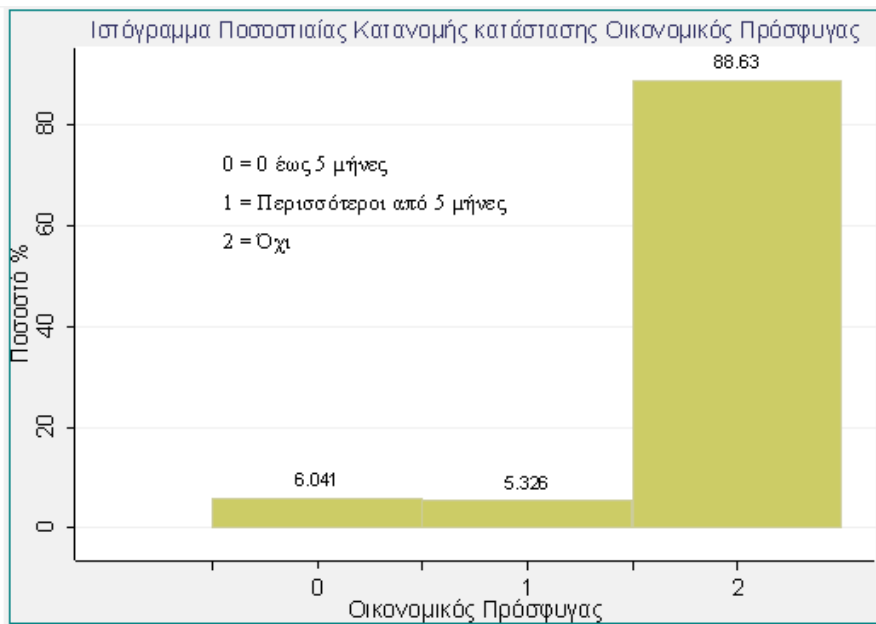
0 = 0 έως 5 μήνες

1 = Περισσότεροι από 5 μήνες

2 = Όχι

Ο αριθμός των καταχωρήσεων που έχουμε με πλήρη στοιχεία για την κατάσταση του Οικονομικού Πρόσφυγα είναι 1.258 και οι συχνότητες, τα ποσοστά εμφάνισης και οι αθροιστικές συχνότητες τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ενώ το ιστόγραμμα που ακολουθεί αποτελεί τη γραφική απεικόνιση αυτών.

| Οικονομικός πρόσφυγας | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|------------------------------|------------------|----------------|-------------------------|
| 0-5 μήνες | 76 | 6.04 | 6.04 |
| >5 μήνες | 67 | 5.33 | 11.37 |
| Όχι | 1,115 | 88.63 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,258 | 100.00 | |



Παρατηρείται ότι ο κύριος όγκος του δείγματος 88,63% δεν είναι οικονομικοί πρόσφυγες.

3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΣΙΑΣ HCV ΜΕ ΆΛΛΑ ΣΜΝ ΑΝΑ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ

3.1. Γενικά

Ακολουθώς μελετάται η συνύπαρξη της μικτής μεταβλητής HCV με άλλα ΣΜΝ, δεδομένου ότι η συμπεριφορά υψηλού κινδύνου που οδήγησε σε μόλυνση από τον HCV είναι αναμενόμενο να οδηγήσει σε έκθεση και σε άλλους αντίστοιχους παράγοντες.

Στόχος της ακόλουθης ανάλυσης είναι η εξέταση του εάν η κατανομή των παρατηρήσεων-ασθενών στις ποικίλες κατηγορίες της μεταβλητής Ηπατίτιδας C με άλλα Σεξουαλικά Μεταδιδόμενα Νοσήματα (HCV και HCV με ποικίλες συλλοιμώξεις ΣΜΝ) γίνεται ανεξάρτητα από τα μελετούμενα δημογραφικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά ή όχι της παρούσας εργασίας, ώστε να αποκτήσουμε μία πληρέστερη εικόνα της επιδημιολογίας του HCV.

Ο έλεγχος αυτός γίνεται με χρήση του συντελεστή X^2 του Pearson.

Με τον όρο ανεξαρτησία νοείται η ανεξαρτησία της «εξαρτημένης» μεταβλητής (ΣΜΝ) κάθε φορά σε σχέση με μία άλλη, «ανεξάρτητη» μεταβλητή (π.χ. Ηλικία, Μορφωτικό Επίπεδο κ.τ.λ.). Δηλαδή, κατά πόσο οι τιμές που λαμβάνει η μεταβλητή HCV + ΣΜΝ επηρεάζονται από τις τιμές των μελετούμενων μεταβλητών. Για το παρόν η χρήση της μεταβλητής Ηλικία θα γίνει ως ποιοτική διατάξιμη, όπως αναλύεται στην αντίστοιχη ενότητα.

Ακολουθώς, παρατίθενται όλοι οι πίνακες ελέγχου στατιστικής ανεξαρτησίας, με χρήση του συντελεστή X^2 του Pearson, μεταξύ της μεταβλητής ΣΜΝ και των ποικίλων ποιοτικών μεταβλητών. Σε κάθε γραμμή δίδονται από πάνω προς τα κάτω:

- η παρατηρούμενη συχνότητα (*observed frequency*),
- η αναμενόμενη συχνότητα (*expected frequency*)
- η τιμή X^2 ανά ζεύγος σύγκρισης
- ο συνολικός συντελεστής X^2 του Pearson του ελέγχου ανεξαρτησίας μεταξύ των εκάστοτε δύο μεταβλητών και
- το p-value του ελέγχου.

3.2. HCV με άλλα ΣΜΝ και φύλο

| STD | Άρρεν | +ύλο Θήλυ | Τρανσέξου | ΣΥΝΟΛΑ |
|--------------------|----------------------|----------------------|-----------------|--------------------------|
| HCV | 796 772.5 0.7 | 207 229.9 2.3 | 1 1.6 0.2 | 1,004 1,004.0 3.2 |
| HCV+HBV | 14 12.3 0.2 | 2 3.7 0.8 | 0 0.0 0.0 | 16 16.0 1.0 |
| HCV+HIV | 81 80.8 0.0 | 24 24.0 0.0 | 0 0.2 0.2 | 105 105.0 0.2 |
| HCV+Σύφιλη | 31 65.4 18.1 | 53 19.5 57.8 | 1 0.1 5.6 | 85 85.0 81.4 |
| HCV+HIV+Σύφιλη | 14 11.5 0.5 | 1 3.4 1.7 | 0 0.0 0.0 | 15 15.0 2.3 |
| HCV+HBV+HIV | 12 9.2 0.8 | 0 2.7 2.7 | 0 0.0 0.0 | 12 12.0 3.6 |
| HCV+HBV+Σύφιλη | 1 0.8 0.1 | 0 0.2 0.2 | 0 0.0 0.0 | 1 1.0 0.3 |
| HCV+HBV+HIV+Σύφιλη | 1 0.8 0.1 | 0 0.2 0.2 | 0 0.0 0.0 | 1 1.0 0.3 |
| HCV+HBV+Άλλο | 1 0.8 0.1 | 0 0.2 0.2 | 0 0.0 0.0 | 1 1.0 0.3 |
| HCV+Σύφιλη+Άλλο | 1 0.8 0.1 | 0 0.2 0.2 | 0 0.0 0.0 | 1 1.0 0.3 |
| HCV+Άλλο | 19 16.2 0.5 | 2 4.8 1.6 | 0 0.0 0.0 | 21 21.0 2.2 |
| ΣΥΝΟΛΑ | 971 971.0 21.2 | 289 289.0 67.8 | 2 2.0 6.1 | 1,262 1,262.0 95.1 |

Pearson chi2 (20) = 95.0692 Pr = 0.000

Ο παρόντας έλεγχος μας δείχνει πως δεν ισχύει η υπόθεση ανεξαρτησίας, αφού ο συντελεστής X^2 του Pearson αντιστοιχεί σε $p\text{-value} < 0,001 < 0,05$. Αυτό, κατά κύριο λόγο, οφείλεται στο γεγονός ότι στην κατηγορία ασθενών με HCV+Σύφιλη είναι κατά πολύ περισσότερες οι γυναίκες από το στατιστικά αναμενόμενο.

3.3. HCV με άλλα ΣΜΝ και μορφωτικό επίπεδο

| ΣΤΟ | Αναλόγηβητ | Δημοτικό | Γυμνάσιο | Γραμματικές Γνώσεις | | ΑΙΣΙ | ΑΕΙ | Μεταπτυχί | ΣΥΝΟΛΑ |
|--------------------|------------|----------|----------|---------------------|-------|------|-------|-----------|---------|
| | | | | Λύκεια | ΙΣΚ | | | | |
| HCV | 25 | 325 | 229 | 149 | 8 | 9 | 248 | 7 | 1,000 |
| | 23.9 | 317.7 | 230.9 | 145.7 | 8.0 | 11.9 | 252.4 | 9.6 | 1,000.0 |
| | 0.1 | 0.2 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.7 | 0.1 | 0.7 | 1.8 |
| HCV+HBV | 0 | 9 | 4 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 16 |
| | 0.4 | 5.1 | 3.7 | 2.3 | 0.1 | 0.2 | 4.0 | 0.2 | 16.0 |
| | 0.4 | 3.0 | 0.0 | 2.3 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.2 | 6.5 |
| HCV+HIV | 4 | 27 | 32 | 12 | 1 | 4 | 23 | 1 | 104 |
| | 2.5 | 33.0 | 24.0 | 15.2 | 0.8 | 1.2 | 26.2 | 1.0 | 104.0 |
| | 0.9 | 1.1 | 2.7 | 0.7 | 0.0 | 6.1 | 0.4 | 0.0 | 11.9 |
| HCV+Σύφιλη | 0 | 27 | 19 | 16 | 0 | 1 | 21 | 1 | 85 |
| | 2.0 | 27.0 | 19.6 | 12.4 | 0.7 | 1.0 | 21.5 | 0.8 | 85.0 |
| | 2.0 | 0.0 | 0.0 | 1.1 | 0.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.8 |
| HCV+HIV+Σύφιλη | 1 | 3 | 4 | 1 | 0 | 0 | 3 | 2 | 14 |
| | 0.3 | 4.4 | 3.2 | 2.0 | 0.1 | 0.2 | 3.5 | 0.1 | 14.0 |
| | 1.3 | 0.5 | 0.2 | 0.5 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 26.0 | 28.9 |
| HCV+HBV+HIV | 0 | 1 | 1 | 5 | 0 | 0 | 4 | 1 | 12 |
| | 0.3 | 3.8 | 2.8 | 1.7 | 0.1 | 0.1 | 3.0 | 0.1 | 12.0 |
| | 0.3 | 2.1 | 1.1 | 6.0 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | 6.8 | 16.9 |
| HCV+HBV+Σύφιλη | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 123.6 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 124.6 |
| HCV+HBV+HIV+Σύφιλη | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.3 | 2.6 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 3.3 |
| HCV+HBV+Άλλα | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.0 | 1.5 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 2.1 |
| HCV+Σύφιλη+Άλλα | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 2.2 | 0.0 | 3.0 |
| HCV+Άλλα | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 14 | 0 | 21 |
| | 0.5 | 6.7 | 4.8 | 3.1 | 0.2 | 0.3 | 5.3 | 0.2 | 21.0 |
| | 0.5 | 0.1 | 4.8 | 3.1 | 0.2 | 2.2 | 14.3 | 0.2 | 25.4 |
| ΣΥΝΟΛΑ | 30 | 399 | 290 | 183 | 10 | 15 | 317 | 12 | 1,256 |
| | 30.0 | 399.0 | 290.0 | 183.0 | 10.0 | 15.0 | 317.0 | 12.0 | 1,256.0 |
| | 5.6 | 9.3 | 12.1 | 14.3 | 124.8 | 9.6 | 18.4 | 34.0 | 228.3 |

Pearson chi2(70) = 228.2681 P < 0.000

Ο παρόντας έλεγχος μας δείχνει πως δεν ισχύει η υπόθεση ανεξαρτησίας, αφού ο συντελεστής X^2 του Pearson αντιστοιχεί σε $p\text{-value} < 0,001 < 0,05$. Αυτό όμως δεν έχει μεγάλη βαρύτητα επιδημιολογικά αφού η στατιστική διαφοροποίηση προκύπτει κύρια από την κατηγορία ασθενών με HCV+HBV+Σύφιλη με μόλις έναν ασθενή όπου δεν υπάρχει

στατιστικά επαρκές μέγεθος δείγματος. Εξάλλου, στην κατηγορία ασθενών με HCV, όπου βρίσκεται ο κύριος όγκος των παρατηρήσεών μας, δεν έχουμε σχεδόν καμία απόκλιση των παρατηρούμενων από τις αναμενόμενες τιμές.

3.4. HCV με άλλα ΣΜΝ και καταγωγή

| ΣΤΟ | Καταγωγή | | | | | | | | ΣΥΝΟΛΑ |
|---------------------------------------|----------|---------|-----------|------|--------|----------|-----------|---------|---------|
| | Ελλάδα | Αμερική | Ανατολική | Ασία | Αφρική | Βαλκάνια | Δυτική Ευ | Ωκεανία | |
| HCV | 848 | 3 | 70 | 28 | 17 | 28 | 8 | 0 | 1,002 |
| | 839.8 | 4.0 | 72.4 | 31.0 | 16.7 | 28.6 | 8.7 | 0.8 | 1,002.0 |
| | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.8 | 1.6 |
| HCV+HBV | 14 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 16 |
| | 13.4 | 0.1 | 1.2 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.1 | 0.0 | 16.0 |
| | 0.0 | 0.1 | 1.2 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 5.3 | 0.0 | 7.8 |
| HCV+HIV | 84 | 1 | 7 | 7 | 2 | 2 | 2 | 0 | 105 |
| | 88.0 | 0.4 | 7.6 | 3.3 | 1.8 | 3.0 | 0.9 | 0.1 | 105.0 |
| | 0.2 | 0.8 | 0.0 | 4.3 | 0.0 | 0.3 | 1.3 | 0.1 | 7.1 |
| HCV+Σύμφιλ | 67 | 0 | 11 | 0 | 1 | 5 | 0 | 1 | 85 |
| | 71.2 | 0.3 | 6.1 | 2.6 | 1.4 | 2.4 | 0.7 | 0.1 | 85.0 |
| | 0.3 | 0.3 | 3.8 | 2.6 | 0.1 | 2.7 | 0.7 | 12.9 | 23.5 |
| HCV+HIV+Σύμφιλ | 14 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 |
| | 12.6 | 0.1 | 1.1 | 0.5 | 0.3 | 0.4 | 0.1 | 0.0 | 15.0 |
| | 0.2 | 14.9 | 1.1 | 0.5 | 0.3 | 0.4 | 0.1 | 0.0 | 17.4 |
| HCV+HBV+HIV | 10 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 12 |
| | 10.1 | 0.0 | 0.9 | 0.4 | 0.2 | 0.3 | 0.1 | 0.0 | 12.0 |
| | 0.0 | 0.0 | 0.9 | 0.4 | 3.2 | 1.3 | 0.1 | 0.0 | 5.9 |
| HCV+HBV+Σύμφιλ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.8 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 |
| HCV+HBV+HIV+Σύμφιλ | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.8 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 |
| HCV+HBV+Άλλα | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.8 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.8 | 0.0 | 11.9 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 12.8 |
| HCV+Σύμφιλ+Άλλα | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.8 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 |
| HCV+Άλλα | 16 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 |
| | 17.6 | 0.1 | 1.5 | 0.7 | 0.3 | 0.6 | 0.2 | 0.0 | 21.0 |
| | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 8.5 | 0.3 | 0.6 | 0.2 | 0.0 | 10.0 |
| ΣΥΝΟΛΑ | 1,056 | 5 | 91 | 39 | 21 | 36 | 11 | 1 | 1,260 |
| | 1,056.0 | 5.0 | 91.0 | 39.0 | 21.0 | 36.0 | 11.0 | 1.0 | 1,260.0 |
| | 1.8 | 16.5 | 19.4 | 17.2 | 4.3 | 5.9 | 7.8 | 13.8 | 86.7 |
| Pearson chi2(70) = 86.7201 P< = 0.085 | | | | | | | | | |

Ο παρόντας έλεγχος μας δείχνει πως ισχύει η υπόθεση ανεξαρτησίας, αφού ο συντελεστής X^2 του Pearson αντιστοιχεί σε $p\text{-value}=0,085>0,05$.

3.5. HCV με άλλα ΣΜΝ και σεξουαλικός προσανατολισμός

| STD | Σεξουαλικός Προσανατολισμός | | | ΣΥΝΟΛΑ |
|--------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------|---------------------------|
| | Ετεροφυλό | Ομοφυλόφι | Αμφιφυλόφ | |
| HCV | 980 928.0 2.9 | 16 64.4 36.4 | 6 9.5 1.3 | 1,002 1,002.0 40.6 |
| HCV+HBV | 15 14.8 0.0 | 1 1.0 0.0 | 0 0.2 0.2 | 16 16.0 0.2 |
| HCV+HIV | 65 57.3 10.7 | 37 6.8 135.6 | 3 1.0 4.0 | 105 105.0 150.3 |
| HCV+Ε0φιλη | 79 78.7 0.0 | 5 5.5 0.0 | 1 0.8 0.0 | 85 85.0 0.1 |
| HCV+HIV+Ε0φιλη | 2 13.9 10.2 | 12 1.0 126.3 | 1 0.1 5.1 | 15 15.0 141.6 |
| HCV+HBV+HIV | 4 11.1 4.6 | 7 0.8 50.3 | 1 0.1 6.9 | 12 12.0 61.7 |
| HCV+HBV+Ε0φιλη | 0 0.9 0.9 | 1 0.1 13.6 | 0 0.0 0.0 | 1 1.0 14.6 |
| HCV+HBV+HIV+Ε0φιλη | 0 0.9 0.9 | 1 0.1 13.6 | 0 0.0 0.0 | 1 1.0 14.6 |
| HCV+HBV+Άλλο | 1 0.9 0.0 | 0 0.1 0.1 | 0 0.0 0.0 | 1 1.0 0.1 |
| HCV+Ε0φιλη+Άλλο | 1 0.9 0.0 | 0 0.1 0.1 | 0 0.0 0.0 | 1 1.0 0.1 |
| HCV+Άλλο | 20 19.4 0.0 | 1 1.4 0.1 | 0 0.2 0.2 | 21 21.0 0.3 |
| ΣΥΝΟΛΑ | 1,167 1,167.0 30.2 | 81 81.0 376.0 | 12 12.0 17.8 | 1,260 1,260.0 424.0 |

Pearson chi2(20) = 424.0190 P = 0.000

Ο παρόντας έλεγχος μας δείχνει πως δεν ισχύει η υπόθεση ανεξαρτησίας, αφού ο συντελεστής X^2 του Pearson αντιστοιχεί σε $p\text{-value}<0,001<0,05$ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Αυτό, κατά κύριο λόγο, οφείλεται στο γεγονός ότι στην κατηγορία ασθενών με HCV οι ομοφυλόφιλοι είναι κατά πολύ λιγότεροι από το στατιστικά αναμενόμενο, ενώ αντίθετα, στην

κατηγορία ασθενών με HCV+HIV οι ομοφυλόφιλοι είναι κατά πολύ περισσότεροι από το στατιστικά αναμενόμενο μοτίβο, με το τελευταίο να παρατηρείται και στις κατηγορίες με HCV+HIV+Σύφιλη και HCV+HBV+HIV, όπου όμως ο αριθμός των παρατηρήσεών μας είναι περιορισμένος (<30) για να προβούμε σε περαιτέρω χαρακτηρισμούς.

3.6. HCV με άλλα ΣΜΝ και αριθμός συντρόφων το τελευταίο εξάμηνο

| STD | Αριθμός Συντρόφων Τελευταίο έμηνο | | ΣΥΝΟΛΑ |
|---|--------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| | 0-5 | >5 | |
| HCV | 712 638.7 8.4 | 287 360.3 14.9 | 999 999.0 23.3 |
| HCV+HBV | 7 10.2 1.0 | 9 5.8 1.8 | 16 16.0 2.8 |
| HCV+HIV | 34 66.5 15.9 | 70 37.5 28.1 | 104 104.0 44.0 |
| HCV+Σύφιλη | 27 54.3 13.8 | 58 30.7 24.4 | 85 85.0 38.1 |
| HCV+HIV+Σύφιλη | 3 9.6 4.5 | 12 5.4 8.0 | 15 15.0 12.6 |
| HCV+HBV+HIV | 1 7.7 5.8 | 11 4.3 10.3 | 12 12.0 16.1 |
| HCV+HBV+Σύφιλη | 0 0.6 0.6 | 1 0.4 1.1 | 1 1.0 1.8 |
| HCV+HBV+HIV+Σύφιλη | 1 0.6 0.2 | 0 0.4 0.4 | 1 1.0 0.6 |
| HCV+HBV+Άλλο | 1 0.6 0.2 | 0 0.4 0.4 | 1 1.0 0.6 |
| HCV+Σύφιλη+Άλλο | 1 0.6 0.2 | 0 0.4 0.4 | 1 1.0 0.6 |
| HCV+Άλλο | 16 13.4 0.5 | 5 7.6 0.9 | 21 21.0 1.4 |
| ΣΥΝΟΛΑ | 803 803.0 51.1 | 453 453.0 90.7 | 1,256 1,256.0 141.8 |
| Pearson chi2 (10) = 141.7976 Pr = 0.000 | | | |

Ο παρόντας έλεγχος μας δείχνει πως δεν ισχύει η υπόθεση ανεξαρτησίας, αφού ο συντελεστής X^2 του Pearson αντιστοιχεί σε $p\text{-value} < 0,001 < 0,05$. Αυτό, κατά κύριο λόγο, οφείλεται στο γεγονός ότι στην κατηγορία ασθενών με HCV οι έχοντες περισσότερους από 5

συντρόφους το τελευταίο 6μηνο είναι κατά πολύ λιγότεροι από το στατιστικά αναμενόμενο, ενώ αντίθετα, στις κατηγορίες ασθενών με HCV+HIV και HCV+Σύφιλη οι έχοντες περισσότερους από 5 συντρόφους το τελευταίο 6μηνο είναι κατά πολύ περισσότεροι από το στατιστικά αναμενόμενο.

3.7. HCV με άλλα ΣΜΝ και χρήση προφυλακτικού

| STD | Χρήση Προφυλακτικού | | | | ΣΥΝΟΛΑ |
|--------------------|---------------------|--------|-----|-------|---------|
| | Όχι | Σπάνια | Ναι | Συχνά | |
| HCV | 28 | 650 | 3 | 320 | 1,001 |
| | 27.9 | 685.6 | 3.2 | 284.3 | 1,001.0 |
| | 0.0 | 1.9 | 0.0 | 4.5 | 6.3 |
| HCV+HBV | 2 | 14 | 0 | 0 | 16 |
| | 0.4 | 11.0 | 0.1 | 4.5 | 16.0 |
| | 5.4 | 0.8 | 0.1 | 4.5 | 10.9 |
| HCV+HIV | 5 | 85 | 0 | 14 | 104 |
| | 2.9 | 71.2 | 0.3 | 29.5 | 104.0 |
| | 1.5 | 2.7 | 0.3 | 8.2 | 12.7 |
| HCV+Σύφιλη | 0 | 67 | 1 | 17 | 65 |
| | 2.4 | 58.2 | 0.3 | 24.1 | 65.0 |
| | 2.4 | 1.3 | 2.0 | 2.1 | 7.8 |
| HCV+HIV+Σύφιλη | 0 | 14 | 0 | 0 | 14 |
| | 0.4 | 9.6 | 0.0 | 4.0 | 14.0 |
| | 0.4 | 2.0 | 0.0 | 4.0 | 6.4 |
| HCV+HBV+HIV | 0 | 11 | 0 | 1 | 12 |
| | 0.3 | 8.2 | 0.0 | 3.4 | 12.0 |
| | 0.3 | 0.9 | 0.0 | 1.7 | 3.0 |
| HCV+HBV+Σύφιλη | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.3 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 |
| HCV+HBV+HIV+Σύφιλη | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.3 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 |
| HCV+HBV+Άλλο | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.3 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 |
| HCV+Σύφιλη+Άλλο | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.3 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 |
| HCV+Άλλο | 0 | 16 | 0 | 5 | 21 |
| | 0.6 | 14.4 | 0.1 | 6.0 | 21.0 |
| | 0.6 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 1.0 |

Ο παρόντας έλεγχος μας δείχνει πως δεν ισχύει η υπόθεση ανεξαρτησίας, αφού ο συντελεστής X^2 του Pearson αντιστοιχεί σε $p\text{-value}=0,013<0,05$. Αυτό όμως δεν έχει μεγάλη βαρύτητα επιδημιολογικά αφού η στατιστική διαφοροποίηση προκύπτει κατά μεγάλο

ποσοστό από την κατηγορία ασθενών με HCV+HBV με μόλις 16 παρατηρήσεις (<30). Αυτό γίνεται ακόμη πιο εμφανές όταν προβούμε στον ίδιο έλεγχο αφαιρώντας από το δείγμα τους ασθενείς με HCV+HBV και επαναλαμβάνοντας ακριβώς τον ίδιο έλεγχο όπου ο συντελεστής χ^2 του Pearson αντιστοιχεί πια σε $p\text{-value}=0,064>0,05$.

| STD | Χρήση Προφυλακτικού | | | | Total |
|--------------------|---------------------|--------|-----|-------|---------|
| | Όχι | Επάνια | Ναι | Συχνά | |
| HCV | 28 | 650 | 3 | 320 | 1,001 |
| | 26.6 | 683.2 | 3.2 | 288.0 | 1,001.0 |
| | 0.1 | 1.6 | 0.0 | 3.6 | 5.3 |
| HCV+HIV | 5 | 85 | 0 | 14 | 104 |
| | 2.8 | 71.0 | 0.3 | 29.9 | 104.0 |
| | 1.8 | 2.8 | 0.3 | 8.5 | 13.4 |
| HCV+Σύφιλη | 0 | 67 | 1 | 17 | 85 |
| | 2.3 | 58.0 | 0.3 | 24.5 | 85.0 |
| | 2.3 | 1.4 | 1.9 | 2.3 | 7.8 |
| HCV+HIV+Σύφιλη | 0 | 14 | 0 | 0 | 14 |
| | 0.4 | 9.6 | 0.0 | 4.0 | 14.0 |
| | 0.4 | 2.1 | 0.0 | 4.0 | 6.5 |
| HCV+HBV+HIV | 0 | 11 | 0 | 1 | 12 |
| | 0.3 | 8.2 | 0.0 | 3.5 | 12.0 |
| | 0.3 | 1.0 | 0.0 | 1.7 | 3.1 |
| HCV+HBV+Σύφιλη | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.3 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 |
| HCV+HBV+HIV+Σύφιλη | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.3 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 |
| HCV+HBV+Άλλο | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.3 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 |
| HCV+Σύφιλη+Άλλο | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 0.3 | 1.0 |
| | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.3 | 0.5 |
| HCV+Άλλο | 0 | 16 | 0 | 5 | 21 |
| | 0.6 | 14.3 | 0.1 | 6.0 | 21.0 |
| | 0.6 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 1.0 |

3.8. ΗCV με άλλα ΣΜΝ και χρήση τοξικών ουσιών

| STD | Χρήση Τοξικών Ουσιών | | | ΣΥΝΟΛΑ |
|--|----------------------|-----------|-----------|---------|
| | Όχι | Όχι Ενδοφ | Ναι Ενδοφ | |
| HCV | 176 | 106 | 720 | 1,002 |
| | 227.0 | 94.0 | 681.0 | 1,002.0 |
| | 11.5 | 1.5 | 2.2 | 15.2 |
| HCV+HBV | 4 | 1 | 11 | 16 |
| | 3.6 | 1.5 | 10.9 | 16.0 |
| | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.2 |
| HCV+HIV | 38 | 4 | 62 | 104 |
| | 23.6 | 9.8 | 70.7 | 104.0 |
| | 8.8 | 3.4 | 1.1 | 13.3 |
| HCV+Σύφιλη | 32 | 7 | 46 | 85 |
| | 19.3 | 8.0 | 57.8 | 85.0 |
| | 8.4 | 0.1 | 2.4 | 10.9 |
| HCV+HIV+Σύφιλη | 10 | 0 | 4 | 14 |
| | 3.2 | 1.3 | 9.5 | 14.0 |
| | 14.7 | 1.3 | 3.2 | 19.2 |
| HCV+HBV+HIV | 4 | 0 | 8 | 12 |
| | 2.7 | 1.1 | 8.2 | 12.0 |
| | 0.6 | 1.1 | 0.0 | 1.7 |
| HCV+HBV+Σύφιλη | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.2 | 0.1 | 0.7 | 1.0 |
| | 2.6 | 0.1 | 0.7 | 3.4 |
| HCV+HBV+HIV+Σύφιλη | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.2 | 0.1 | 0.7 | 1.0 |
| | 2.6 | 0.1 | 0.7 | 3.4 |
| HCV+HBV+Άλλο | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.2 | 0.1 | 0.7 | 1.0 |
| | 2.6 | 0.1 | 0.7 | 3.4 |
| HCV+Σύφιλη+Άλλο | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0.2 | 0.1 | 0.7 | 1.0 |
| | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.5 |
| HCV+Άλλο | 18 | 0 | 3 | 21 |
| | 4.8 | 2.0 | 14.3 | 21.0 |
| | 36.9 | 2.0 | 8.9 | 47.7 |
| Total | 285 | 118 | 855 | 1,258 |
| | 285.0 | 118.0 | 855.0 | 1,258.0 |
| | 89.1 | 10.0 | 20.0 | 119.1 |
| Pearson chi2 (20) = 119.0840 P = 0.000 | | | | |

Ο παρόντας έλεγχος μας δείχνει πως δεν ισχύει η υπόθεση ανεξαρτησίας, αφού ο συντελεστής X^2 του Pearson αντιστοιχεί σε $p\text{-value} < 0,001 < 0,05$. Αυτό οφείλεται, σχεδόν ισόποσα, σε πολλές από τις κατηγορίες.

3.9. ΗCV με άλλα ΣΜΝ και μεταβλητή “οικονομικός πρόσφυγας”

| ΕΤΔ | Οικονομικός Πρόσφυγας | | | ΣΥΝΟΛΑ |
|--------------------|-----------------------|----------|----------|----------|
| | 0-5 μήνες | >5 μήνες | Όχι | |
| ΗCV | 63 | 50 | 888 | 1, 001 |
| | 60.5 | 53.3 | 887.2 | 1, 001.0 |
| | 0.1 | 0.2 | 0.0 | 0.3 |
| ΗCV+ΗΒV | 1 | 0 | 15 | 16 |
| | 1.0 | 0.0 | 14.2 | 16.0 |
| | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| ΗCV+ΗΙV | 7 | 5 | 92 | 104 |
| | 6.3 | 5.5 | 92.2 | 104.0 |
| | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.1 |
| ΗCV+Ε0φιλη | 3 | 8 | 74 | 85 |
| | 5.1 | 4.5 | 75.3 | 85.0 |
| | 0.9 | 2.7 | 0.0 | 3.6 |
| ΗCV+ΗΙV+Ε0φιλη | 0 | 0 | 15 | 15 |
| | 0.9 | 0.8 | 13.3 | 15.0 |
| | 0.9 | 0.8 | 0.2 | 1.9 |
| ΗCV+ΗΒV+ΗΙV | 1 | 1 | 10 | 12 |
| | 0.7 | 0.6 | 10.6 | 12.0 |
| | 0.1 | 0.2 | 0.0 | 0.3 |
| ΗCV+ΗΒV+Ε0φιλη | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0.1 | 0.1 | 0.9 | 1.0 |
| | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.1 |
| ΗCV+ΗΒV+ΗΙV+Ε0φιλη | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0.1 | 0.1 | 0.9 | 1.0 |
| | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.1 |
| ΗCV+ΗΒV+Άλλο | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | 0.1 | 0.1 | 0.9 | 1.0 |
| | 0.1 | 16.8 | 0.9 | 17.8 |
| ΗCV+Ε0φιλη+Άλλο | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | 0.1 | 0.1 | 0.9 | 1.0 |
| | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.1 |
| ΗCV+Άλλο | 1 | 2 | 18 | 21 |
| | 1.3 | 1.1 | 18.6 | 21.0 |
| | 0.1 | 0.7 | 0.0 | 0.8 |
| ΣΥΝΟΛΑ | 76 | 67 | 1, 115 | 1, 258 |
| | 76.0 | 67.0 | 1, 115.0 | 1, 258.0 |
| | 2.4 | 22.5 | 1.3 | 26.1 |

Pearson chi2(2D) = 26.1258 Pr = 0.162

Ο παρόντας έλεγχος μας δείχνει πως ισχύει η υπόθεση ανεξαρτησίας, αφού ο συντελεστής X^2 του Pearson αντιστοιχεί σε $p\text{-value}=0,162>0,05$.

3.10. HCV με άλλα ΣΜΝ και ηλικία

Για την ευκολότερη ανάλυση των δεδομένων μας προχωρήσαμε σε ομαδοποίηση της ποσοτικής συνεχούς μεταβλητής Ηλικίας σε ποιοτική διατάξιμη στις παρακάτω κατηγορίες (περίπου ανά 10ετία):

0 = <31 ετών

1 = 31-40 ετών

2 = 41-50 ετών

3 = 51-60 ετών

4 = 61-70 ετών

5 = >70 ετών

| Ηλικία | Συχνότητα | Ποσοστό | Αθροιστική Συχν. |
|---------------|------------------|----------------|-------------------------|
| <31 | 327 | 25.91 | 25.91 |
| 31-40 | 657 | 52.06 | 77.97 |
| 41-50 | 171 | 13.55 | 91.52 |
| 51-60 | 75 | 5.94 | 97.46 |
| 61-70 | 22 | 1.74 | 99.21 |
| >70 | 10 | 0.79 | 100.00 |
| Σύνολα | 1,262 | 100.00 | |

| STD | Ηλικία | | | | | | ΣΥΝΟΛΑ |
|--------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-----|---------|
| | <31 | 31-40 | 41-50 | 51-60 | 61-70 | >70 | |
| HCV | 265 | 547 | 113 | 54 | 16 | 10 | 1,005 |
| | 260.4 | 523.2 | 136.2 | 59.7 | 17.5 | 8.0 | 1,005.0 |
| | 0.1 | 1.1 | 2.9 | 0.5 | 0.1 | 0.5 | 6.2 |
| HCV+HBV | 6 | 7 | 2 | 0 | 0 | 0 | 16 |
| | 4.1 | 8.2 | 2.2 | 1.0 | 0.2 | 0.1 | 16.0 |
| | 0.8 | 0.2 | 0.2 | 1.0 | 0.2 | 0.1 | 2.7 |
| HCV+HIV | 26 | 29 | 23 | 2 | 2 | 0 | 104 |
| | 26.9 | 54.1 | 14.1 | 6.2 | 1.8 | 0.8 | 104.0 |
| | 0.0 | 4.2 | 25.4 | 1.6 | 0.8 | 0.8 | 32.9 |
| HCV+Σύφιλη | 12 | 50 | 11 | 9 | 2 | 0 | 85 |
| | 22.0 | 44.2 | 11.5 | 5.1 | 1.5 | 0.7 | 85.0 |
| | 4.6 | 0.7 | 0.0 | 2.1 | 1.6 | 0.7 | 10.6 |
| HCV+HIV+Σύφιλη | 2 | 4 | 2 | 6 | 0 | 0 | 15 |
| | 2.9 | 7.8 | 2.0 | 0.9 | 0.2 | 0.1 | 15.0 |
| | 0.9 | 1.9 | 0.5 | 29.2 | 0.2 | 0.1 | 32.9 |
| HCV+HBV+HIV | 4 | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 12 |
| | 2.1 | 6.2 | 1.6 | 0.7 | 0.2 | 0.1 | 12.0 |
| | 0.2 | 0.8 | 1.2 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 2.6 |
| HCV+HBV+Σύφιλη | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.2 | 0.5 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.2 | 0.4 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.9 |
| HCV+HBV+HIV+Σύφιλη | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.2 | 0.5 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 1.0 |
| | 0.2 | 0.5 | 0.1 | 14.9 | 0.0 | 0.0 | 15.8 |
| HCV+HBV+Ξάλλο | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.2 | 0.5 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 1.0 |
| | 2.1 | 0.5 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 2.9 |
| HCV+Σύφιλη+Ξάλλο | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 0.2 | 0.5 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 1.0 |
| | 2.1 | 0.5 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 2.9 |
| HCV+Ξάλλο | 10 | 5 | 5 | 1 | 0 | 0 | 21 |
| | 5.4 | 10.9 | 2.8 | 1.2 | 0.4 | 0.2 | 21.0 |
| | 2.8 | 2.2 | 1.6 | 0.0 | 0.4 | 0.2 | 9.2 |

Ο παρόντας έλεγχος μας δείχνει πως δεν ισχύει η υπόθεση ανεξαρτησίας, αφού ο συντελεστής X^2 του Pearson αντιστοιχεί σε $p\text{-value} < 0,001 < 0,05$. Αυτό, κατά κύριο λόγο, οφείλεται στο γεγονός ότι στις κατηγορίες ασθενών με HCV+HIV και HCV+HIV+Σύφιλη είναι κατά πολύ περισσότεροι οι ασθενείς των ηλικιακών ομάδων 41-50 και 51-60 ετών, αντίστοιχα, από το στατιστικά αναμενόμενο.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί επιδημιολογική μελέτη της HCV λοίμωξης σε σύνολο 1543 ασθενών με HCV, οι οποίοι προσήλθαν στο Τμήμα Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων και AIDS του νοσοκομείου "ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΥΓΓΡΟΣ" κατά τη χρονική περίοδο 2004-2012. Στα πλαίσια της εργασίας διερευνήθηκε ένα ευρύ φάσμα μεταβλητών. Πιο συγκεκριμένα, οι παράμετροι που μελετήθηκαν αφορούσαν **δημογραφικά** χαρακτηριστικά, όπως φύλο, ηλικία, εθνικότητα, κοινωνικό και μορφωτικό επίπεδο, καθώς και **επιδημιολογικά**, όπως η χρήση τοξικών ουσιών, ο σεξουαλικός προσανατολισμός, η εναλλαγή ερωτικών συντρόφων, η χρήση προφυλακτικού και η συνύπαρξη της HCV λοίμωξης με άλλα Σεξουαλικά Μεταδιδόμενα Νοσήματα (ΣΜΝ).

Όπως παρατηρήθηκε, η προσέλευση των ασθενών κατά τα έτη 2004 έως και 2012 ήταν ομοιόμορφη, με ελάχιστη προσέλευση ανά έτος 144 ασθενείς (9,33%-2007) και μέγιστη 194 ασθενείς (12,57%-2010). Η συντριπτική πλειοψηφία αυτών χαρακτηρίζονται ως άεργοι, αφού το ποσοστό τους στον εξεταζόμενο πληθυσμό ανέρχεται σε 50,23%. Το ποσοστό αυτό περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τρόφιμους σωφρονιστικών ιδρυμάτων, με συνηθέστερες τις σχετιζόμενες με χρήση ναρκωτικών παραβατικές συμπεριφορές. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι το 77,34% του παρόντος πληθυσμού δήλωσε χρήστης κάποιου είδους τοξικής ουσίας και ότι το 83,82% ήταν ελληνικής καταγωγής.

Από τη στατιστική επεξεργασία των επιλεγμένων μεταβλητών προέκυψαν σημαντικά αποτελέσματα, η ερμηνεία των οποίων οδηγεί σε χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την επιδημιολογία του HCV. Το 31,77% των ασθενών που μελετήθηκαν είναι απόφοιτοι δημοτικού, ενώ ακολουθούν οι απόφοιτοι ανώτατης τριτοβάθμιας εκπαίδευσης με ποσοστό 25,24%. Έτσι προκύπτει ότι η μέση παρατήρηση στο δείγμα μας αντιστοιχεί σε επίπεδο γραμματικών γνώσεων αποφοίτου Λυκείου. Ανάλογα αποτελέσματα εξήχθησαν και από τη μελέτη των Raptopoulou *et al.*, η οποία δημοσιεύτηκε το 2011 και αφορούσε τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C [64]. Σύμφωνα με την

έρευνα αυτή, το 28,6% των ατόμων με χρόνια HCV λοίμωξη είναι απόφοιτοι δημοτικού και το 22% πτυχιούχοι ανώτατης τριτοβάθμιας εκπαίδευσης. Ομοίως υψηλό ποσοστό (80%) ασθενών με χαμηλό μορφωτικό επίπεδο αναφέρεται και σε παλαιότερη μελέτη των Barbieri *et. al.*, σκοπός της οποίας ήταν ο καθορισμός της συχνότητας και του προφίλ των ασθενών με συλλοίμωξη HCV-HIV [83].

Διαπιστώθηκε ακόμη, ότι το 83,82% του συνόλου που εξετάστηκε είναι ελληνικής καταγωγής και το 88,63% δεν ανήκει στην κατηγορία των οικονομικών προσφύγων. Επίσης, η μέση ηλικία των ασθενών με HCV λοίμωξη αντιστοιχεί στα 35,9±9,4 έτη και το 52,06% εντάσσεται στην ηλικιακή κατηγορία 31-40. Η ηπατίτιδα C είναι ενδημική στα περισσότερα μέρη του κόσμου με ποσοστό που εκτιμάται ότι φθάνει το 3%. Ωστόσο, η συχνότητα και η εξάπλωση της νόσου παρουσιάζουν αξιοσημείωτη γεωγραφική και χρονική διαφοροποίηση. Χαρακτηριστική είναι η μελέτη των Wasley και Alter, η οποία εστιάζει σε αυτούς τους γεωγραφικούς και χρονολογικούς παράγοντες που όπως φαίνεται επηρεάζουν την επιδημιολογία της νόσου [58]. Πιο αναλυτικά, η έρευνα των Wasley και Alter έδειξε ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες καθώς και στην Αυστραλία, οι περισσότερες λοιμώξεις εντοπίζονται σε ηλικίες από 30 έως 49 ετών με κυρίαρχο παράγοντα μετάδοσης την ενδοφλέβια χρήση τοξικών ουσιών, στοιχεία που συμφωνούν με τα αντίστοιχα της παρούσας διατριβής. Δύο ακόμη μελέτες με παρόμοια αποτελέσματα είναι αυτές των Savvas *et al* και Barbieri *et. al.* Πιο αναλυτικά, οι Savvas *et al.* σε μελέτη τους σχετικά με τις αλλαγές στην επιδημιολογία της HCV λοίμωξης και το πώς αυτές επιδρούν στην ασθένεια του ήπατος, έδειξαν ότι η μέση ηλικία των ασθενών με HCV λοίμωξη που εξετάστηκαν κατά την περίοδο 1996–2000 ήταν τα 46.2 έτη [90]. Από την εργασία των Barbieri *et. al.* που αναφέρθηκε καινωρίτερα αναφέρεται ότι το 60,1% των ασθενών που μολύνθηκαν μέσω σεξουαλικής επαφής ανήκε στην ηλικιακή κατηγορία 25-40 [83]. Αντιθέτως, στην Ιαπωνία και Ιταλία βρέθηκε ότι η πλειοψηφία των λοιμώξεων αφορά ηλικιωμένους ανθρώπους, ενώ στην Αίγυπτο, υψηλά ποσοστά μόλυνσης παρατηρούνται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες. Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις, η μη ασφαλής χρήση βελονών και ο μολυσμένος ιατρικός εξοπλισμός φαίνεται να αποτελούν τους κυρίαρχους παράγοντες μετάδοσης του HCV. Το 2012 δημοσιεύτηκε η μελέτη των Pneumaticos *et. al.*, σκοπός της οποίας ήταν η διερεύνηση της εξάπλωσης των HBV, HCV και HIV ιών σε ασθενείς που νοσηλεύονταν στο ορθοπεδικό τμήμα ελληνικού

πανεπιστημιακού νοσοκομείου [92]. Από τους 1.694 ασθενείς που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε ότι το 89,4% ήταν κάτοικοι αστικών περιοχών και το 83,3% ήταν ελληνικής εθνικότητας, ποσοστό που σχεδόν ταυτίζεται με το 83,82% που καταγράφηκε στην παρούσα εργασία. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων στη μελέτη των Pneumaticos *et. al.* αποκάλυψε επίσης ότι η μη-ελληνική καταγωγή αποτέλεσε τον μοναδικό παράγοντα υψηλού κινδύνου για την εκδήλωση της λοίμωξης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη των Karatapanis *et. al.*, η οποία αφορά τον HCV γονότυπο 5 (G5) [94]. Ο συγκεκριμένος γονότυπος εντοπίζεται κυρίως στη Νότια Αφρική, ωστόσο διαρκώς αυξάνονται οι αναφορές που υποδηλώνουν τη σποραδική παρουσία του σε Ευρωπαϊκές χώρες. Για την αξιολόγηση λοιπόν της επιδημιολογίας του γονότυπου 5, πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα ασθενών προερχόμενο από 7 διαφορετικά ηπατολογικά κέντρα της Ελλάδας. Το υψηλότερο ποσοστό των ασθενών με HCV G5 καταγράφηκε στο Γενικό Νοσοκομείο της Ρόδου, όπου διαπιστώθηκε ότι η μέση ηλικία των προσβληθέντων αντιστοιχεί σε 62.3 ± 5 έτη, τιμή αρκετά μεγαλύτερη από τη μέση ηλικία των ασθενών που είχαν προσβληθεί από διαφορετικούς HCV γονότυπους (40.6 ± 7.2 έτη).

Αναλύοντας στατιστικά τον παράγοντα φύλο, βρέθηκε ότι το 76,96% των ασθενών του δείγματος που πάσχουν αποκλειστικά από ηπατίτιδα C είναι άνδρες. Ανάλογα αποτελέσματα ως προς το φύλο των ασθενών με HCV λοίμωξη προέκυψαν και από τη μελέτη των Savvas *et al.* [90], σύμφωνα με την οποία το 55,5% του εξετασθέντος πληθυσμού ήταν άνδρες, έναντι του 44,5% που ήταν γυναίκες. Επίσης, οι Barbieri *et. al.* μελετώντας τη συνύπαρξη των λοιμώξεων HIV και HCV, αναφέρουν ότι το 72,9% των ασθενών που μολύνθηκαν μέσω σεξουαλικής επαφής ήταν άνδρες [83]. Αρκετές όμως είναι και οι δημοσιευμένες μελέτες, τα στοιχεία των οποίων αντικρούουν τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι Vasquez *et al.* αντλώντας στοιχεία από κλινική Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων της Ρωσίας επισημαίνουν ότι οι γυναίκες που προβαίνουν σε σεξουαλική επαφή χωρίς προφύλαξη είναι πολύ περισσότερες συγκριτικά με τους άνδρες, γεγονός που παράλληλα δικαιολογεί το 37,7% εμφάνισης ΣΜΝ σε γυναίκες έναντι του 20,3% των ανδρών [77]. Στη μελέτη των Pneumaticos *et. al.* διαπιστώθηκε ότι από τους 1.694 ασθενείς που εξετάστηκαν, το 53% ήταν γυναίκες [92]. Ομοίως, οι Karatapanis *et. al.* έδειξαν ότι από το σύνολο των

ασθενών του νοσοκομείου της Ρόδου που είχαν μολυνθεί με HCV G5, το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν γυναίκες (81.2%) [94].

Από την παρούσα μελέτη προέκυψε επίσης ότι η χρήση ναρκωτικών αποτελεί τον κύριο επιδημιολογικό παράγοντα, αφού το 77,35% του συνόλου των ασθενών που εξετάστηκαν αποτελείται από χρήστες τοξικών ουσιών, ποσοστό αναμενόμενο από τη γνώση της διεθνούς επιδημιολογίας της νόσου. Να σημειωθεί ότι το 67,97% του παραπάνω ποσοστού αφορά χρήστες ενδοφλέβιων τοξικών ουσιών. Πλειοψηφία ανάλογων δημοσιευμένων μελετών συμφωνεί με αυτά τα αποτελέσματα. Ενδεικτικά, οι Vasquez *et al.*, αναφέρουν ότι το 80,3% των ανδρών που εισήλθαν σε κλινική Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων έκαναν χρήση τοξικών ουσιών [77]. Η επιδημιολογική μελέτη των Nelson *et. al.* που διεξήχθη σε παγκόσμια κλίμακα και αφορά την παρουσία των HBV και HCV σε χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών, αναφέρει ότι περίπου 10 εκατομμύρια χρηστών έχουν βρεθεί θετικοί στον έλεγχο για ηπατίτιδα C με βάση τα στοιχεία που συλλέχθηκαν από 77 χώρες [93]. Σε μελέτη των Dalekos *et. al.* που πραγματοποιήθηκε στα Ιωάννινα, προσδιορίστηκαν οι HBV και HCV δείκτες (HBsAg, HBsAb, HBcAb και αντι-HCV) σε χρόνιους αλκοολικούς με ή χωρίς εκδηλωμένη ασθένεια στο ήπαρ [91]. Τα άτομα που εξετάστηκαν αποτελούνταν από 70 μη αλκοολικούς νοσηλευόμενους ασθενείς, 60 χρήστες ηρωίνης, αλλά και 1342 υγιείς αιμοδότες. Το γεγονός ότι στο 90% των χρηστών ηρωίνης παρατηρήθηκαν αντισώματα έναντι του HCV ενισχύει το αποτέλεσμα της παρούσας διατριβής αναφορικά με τη συσχέτιση της χρήσης ναρκωτικών ουσιών με την HCV λοίμωξη. Σε μελέτη των Katsoulidou *et. al.*, σκοπός της οποίας ήταν η εκτίμηση της συνολικής γονοτυπικής κατανομής του HCV τις τελευταίες δεκαετίες στην Ελλάδα, βρέθηκε ότι ο γονότυπος 3 εντοπίζεται κυρίως σε χρήστες τοξικών ουσιών, με ποσοστό που αγγίζει το 58,2% [82]. Χαρακτηριστική επίσης είναι και η έρευνα των Corson *et. al.* σύμφωνα με την οποία, το 38% των HCV λοιμώξεων στη Σκωτία οφείλεται σε κοινές χρήσεις βελονών-συρίγγων μεταξύ των χρηστών ενδοφλέβιων ουσιών [80]. Παρόμοια είναι και η μελέτη των Lee *et. al.*, που δημοσιεύτηκε το 2008 και από την οποία προέκυψε ότι το 62% των 567 χρηστών που εξετάστηκαν συνολικά μοιράζονταν τα σύνεργα της δόσης τους και η παρουσία αντισωμάτων έναντι του HCV φάνηκε να επικρατεί με ποσοστό 85% [84].

Οι σεξουαλικές προτιμήσεις, η συχνή εναλλαγή συντρόφων και η ύπαρξη συλλοιμώξεων αποτελούν σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διατριβής παραμέτρους που συνδέονται με την επιδημιολογία του HCV. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το 92,95% των ασθενών που έλαβαν μέρος στη μελέτη είναι ετεροφυλόφιλοι, ενώ μεγάλη είναι και η αναλογία των ατόμων που δηλώνουν ότι ο αριθμός των συντρόφων τους το τελευταίο εξάμηνο υπερβαίνει τους πέντε (36%). Επίσης, το 20,41% των ασθενών παρουσιάζει συνύπαρξη της HCV λοίμωξης με κάποιο άλλο ΣΜΝ, συχνότερο από τα οποία φαίνεται να είναι η επίκτητη ανοσολογική ανεπάρκεια, με ποσοστό 10,5%, ενώ ακολουθούν οι συλλοιμώσεις με σύφιλη και HBV με ποσοστά 6,72% και 1,27%, αντίστοιχα. Παρόμοια στοιχεία προκύπτουν και από διαφορετικές μελέτες, όπως για παράδειγμα αυτήν των Shrestha *et al.*, που δημοσιεύτηκε το 2012 και είχε ως στόχο τον καθορισμό της συχνότητας των συλλοιμώξεων των HIV, HBV και σύφιλης σε HCV αιμοδότες [97]. Συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των ανδρών που εξετάστηκαν στη μελέτη ήταν ετεροφυλόφιλοι, στοιχείο που συνάδει με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής. Η ίδια μελέτη αναφέρει ότι η συνύπαρξη του HCV με τους ιούς HIV, HBV και σύφιλης οφείλεται στους κοινούς τρόπους μετάδοσής τους και στις μη ασφαλείς σεξουαλικές πρακτικές, όπως φάνηκε μετά από σχετική έρευνα που διεξήχθη σε 139 HCV ασθενείς. Αναφέρεται επίσης πως η κοινή χρήση βελονών και η σεξουαλική επαφή χωρίς προφύλαξη ανάμεσα σε χρήστες ναρκωτικών ουσιών αποτελούν ενοχοποιητικούς παράγοντες για την υψηλή συχνότητα μετάδοσης του HCV, αλλά και την εμφάνιση συλλοιμώξεων στα άτομα που ανήκουν στη συγκεκριμένη ομάδα κινδύνου. Επιπλέον, η HIV-HCV καταγράφηκε ως η πιο συχνή περίπτωση συλλοιμώξεως, ενώ ακολούθησαν οι συλλοιμώσεις με σύφιλη και HBV, παρατηρήσεις που ταυτίζονται με τις αντίστοιχες της παρούσας διατριβής. Η μελέτη των Hussain *et al.*, στην οποία συμμετείχαν 863 ασθενείς νοσηλευόμενοι σε κλινικές Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων στη Βόρεια Ινδία, έδειξε ότι το 2,4% έπασχε από HIV, το 2,9% από HBV, το 1% από HCV και το 5,4% από σύφιλη [98]. Η συχνότητα HBV θετικών δειγμάτων ήταν υψηλότερη στους άνδρες (4,4%) σε αντίθεση με τις γυναίκες (2,4%). Οι συλλοιμώσεις που παρατηρήθηκαν είχαν ως εξής: HIV-HBV με ποσοστό 0,2%, HBV-HCV με ποσοστό 0,1%, σύφιλη-HIV επίσης με ποσοστό 0,1%, ενώ δεν καταγράφηκε καμία περίπτωση συλλοιμώξεως HIV-HCV, γεγονός που δε συνάδει με τα αντίστοιχα στοιχεία της παρούσας διατριβής. Οι Guo *et al.*

μελέτησαν τα χαρακτηριστικά και τις τάσεις των λοιμώξεων από HIV και σύφιλη σε χρήστες ναρκωτικών ουσιών στην Κίνα κατά την περίοδο 1995-2009 [96]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, το 6,2% των χρηστών βρέθηκε ότι πάσχει από τον ιό της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας και το 3,7% από σύφιλη. Αντιθέτως, οι Barbieri *et. al.* αναφέρουν την συνύπαρξη των λοιμώξεων HIV και HCV σε ποσοστά που κυμαίνονται από 30% έως και 90%, ανάλογα με τους τρόπους μετάδοσης. Από τη μελέτη τους προκύπτει επίσης, ότι συχνότερος τρόπος μόλυνσης ήταν η σεξουαλική επαφή (84.3%) και ότι το 68.6% των ασθενών ήταν ετεροφυλόφιλοι, ποσοστό που πλησιάζει αρκετά το 92,95% που βρέθηκε στην παρούσα διατριβή [83]. Αξιοσημείωτη είναι και η έρευνα των Elefsiniotis *et. al.*, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οποίας, οι χρήστες τοξικών ουσιών που ήταν θετικοί για HCV λοίμωξη και παράλληλα είχαν ιστορικό HBV λοίμωξης αποτελούσαν το 82,8% του συνόλου των χρηστών που μελετήθηκαν [88].

Η μελέτη των Vasquez *et al.*[77] αναδεικνύει τη χρήση προφυλακτικού ως έναν από τους παράγοντες που συνδέονται άμεσα με την εξάπλωση της ηπατίτιδας C, αφού σύμφωνα με τα αποτελέσματα της, το 60,5% των γυναικών και το 17,8% των ανδρών από το σύνολο των ατόμων που εισήλθαν σε κλινική Σεξουαλικώς Μεταδιδόμενων Νοσημάτων δε χρησιμοποιούσαν προφυλακτικό κατά τη σεξουαλική επαφή. Ομοίως, στην παρούσα διατριβή και μέσα από στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, βρέθηκε ότι το 68,5% των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη χρησιμοποιούσαν σπανίως προφυλακτικό. Ωστόσο, δε θεωρείται αμελητέο το ποσοστό (28,7%) των ασθενών που έκαναν συχνή χρήση προφυλακτικού. Σε παρόμοια μελέτη των Shrestha *et al.* αναφέρεται η σεξουαλική επαφή χωρίς προφύλαξη ως ενοχοποιητικός παράγοντας για την υψηλή συχνότητα μετάδοσης του HCV [97].

Στην πορεία της παρούσας εργασίας μελετήθηκε επίσης η μεικτή μεταβλητή της συνύπαρξης της HCV λοίμωξης με άλλα ΣΜΝ, με σκοπό να αποκτηθεί μια πληρέστερη εικόνα σχετικά με την επιδημιολογία της νόσου. Αυτό προέκυψε αφενός λόγω της φύσης του νοσοκομείου στο οποίο διεξήχθη η έρευνα και αφετέρου λόγω των χαρακτηριστικών των εξετασθέντων ασθενών. Στόχος αυτής της επιμέρους στατιστικής επεξεργασίας ήταν η διερεύνηση της σχέσης εξάρτησης της μεικτής μεταβλητής με τις υπόλοιπες μεταβλητές-παραμέτρους της μελέτης.

Πιο αναλυτικά, η μεταβλητή του φύλου φάνηκε να επιδρά ιδιαίτερα στη συνύπαρξη του HCV με τον ιό της σύφιλης, καθώς από τους 85 ασθενείς με τη συγκεκριμένη συλλοιμώξη, οι 53 ήταν γυναίκες, αριθμός αρκετά μεγαλύτερος από τον στατιστικά αναμενόμενο (19 ασθενείς).

Παρόλο που ο αριθμός των ομοφυλόφιλων ατόμων θετικών για HCV (16 ασθενείς) βρέθηκε εμφανώς μειωμένος συγκριτικά με τον στατιστικά αναμενόμενο (64 ασθενείς) στο σύνολο των 1002 ασθενών του δείγματος, δε βρέθηκε να ισχύει κάτι ανάλογο και στην περίπτωση των συλλοιμώξεων. Σε αρκετές συλλοιμώξεις (HCV-HIV, HCV-HIV-σύφιλη, HCV-HBV-HIV) και ιδιαίτερα στην HCV-HIV, ο αριθμός των ομοφυλόφιλων έφτασε τους 37 ασθενείς, έναντι των μόλις 7 που αναμένονταν από τη στατιστική ανάλυση σε ένα σύνολο 105 ασθενών που έπασχαν από HCV-HIV. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει άμεσο συσχετισμό της σεξουαλικής προτίμησης με τη συνύπαρξη της HCV λοίμωξης με άλλα Σεξουαλικά Μεταδιδόμενα Νοσήματα.

Η συχνή εναλλαγή συντρόφων φάνηκε να αποτελεί ακόμη έναν παράγοντα που συνδέεται άμεσα με την παρουσία συλλοιμώξεων. Αν και οι ασθενείς με HCV που δήλωσαν ότι ο αριθμός των διαφορετικών συντρόφων τους το τελευταίο 6μηνο ξεπέρασε τους 5 αναμένονταν περισσότεροι από αυτούς που τελικά βρέθηκαν (287 έναντι των 360 στατιστικά αναμενόμενων), στις συλλοιμώξεις HCV-HIV και HCV-σύφιλη, οι ίδιοι ασθενείς βρέθηκαν εμφανώς αυξημένοι σε σχέση με τη στατιστική εκτίμηση (70 ασθενείς έναντι των 37 και 58 έναντι των 31, αντίστοιχα).

Κάτι ανάλογο ισχύει και με τους μη χρήστες τοξικών ουσιών του δείγματος που εξετάστηκε. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των μη χρηστών, θετικών για HCV ανέρχεται στους 176 και είναι συγκριτικά μικρότερος από τον αντίστοιχο στατιστικά αναμενόμενο (227 ασθενείς) στο σύνολο των 1002 ασθενών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Αντιθέτως, η ίδια κατηγορία ασθενών σε αρκετές περιπτώσεις συλλοιμώξεων (HCV-HIV, HCV-Σύφιλη, HCV-HIV-Σύφιλη, HCV-Άλλο) βρέθηκε αριθμητικά αυξημένη από ό,τι αναμενόταν στο παρόν δείγμα.

Παρατηρήθηκε επίσης, ότι ο αριθμός των ασθενών που ανήκαν στις ηλικιακές ομάδες 41-50 και 51-60 ετών και έπασχαν από συλλοιμώξεις HCV-HIV και HCV-HIV-Σύφιλη, αντίστοιχα ήταν αρκετά πιο αυξημένος από τον στατιστικά αναμενόμενο (33 ασθενείς έναντι 14 αναμενόμενων και 6 έναντι 1 αναμενόμενου, αντίστοιχα), γεγονός που υποδηλώνει συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και συλλοιμώξης.

Αντιθέτως, ο αριθμός των ασθενών με HCV και ΣΜΝ ανά κατηγορία μελέτης βρέθηκε ότι είναι ανεξάρτητος από τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών του δείγματος.

Συνεπώς, από δημογραφικής άποψης προκύπτει ότι το μερίδιο του μελετώμενου πληθυσμού που ανήκει στην ευρύτερη ηλικιακή ομάδα των 41-60 ετών νοσεί στατιστικά συχνότερα από συλλοιμώξεις της HCV με άλλα ΣΜΝ σε σχέση με τις λοιπές πληθυσμιακές ομάδες, ενώ τα υπόλοιπα δημογραφικά χαρακτηριστικά, όπως είναι οι γραμματικές γνώσεις, η καταγωγή, η χρήση προφυλακτικού και η οικονομική μετανάστευση δε δείχνουν κάποια στατιστική συσχέτιση. Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα από επιδημιολογική σκοπιά προκύπτει ότι στο δείγμα που εξετάστηκε, οι χρήστες τοξικών ουσιών, οι έχοντες περισσότερους των 5 συντρόφων το τελευταίο 6μηνο και οι ομοφυλόφιλοι προσβάλλονται από συλλοιμώξεις της HCV με άλλα ΣΜΝ με συχνότητα στατιστικά μεγαλύτερη, έναντι της αντίστοιχης των υπολοίπων πληθυσμιακών ομάδων, ενώ τα λοιπά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά δεν εμφανίζουν κάποια στατιστική συσχέτιση.

4.2. Συμπεράσματα

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη οδήγησε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Ως προς το μορφωτικό επίπεδο των ασθενών οι απόφοιτοι δημοτικού φαίνεται να επικρατούν με ποσοστό 31,77%.
- Ως προς την καταγωγή του εξεταζόμενου πληθυσμού βρέθηκε ότι το 83,82% είναι Έλληνες.
- Ως προς τη μεταβλητή οικονομικός πρόσφυγας η εργασία έδειξε ότι το 88,63% δεν εντάσσεται σε αυτή την κατηγορία.
- Ως προς την ηλικία, το 52,06% των ασθενών ανήκει στην κατηγορία από 31 έως 40 ετών.
- Ως προς τη μεταβλητή του φύλου βρέθηκε ότι οι ασθενείς του δείγματος που μελετήθηκε είναι κατά κύριο λόγο άνδρες (76,96%) .
- Ως προς τη χρήση προφυλακτικού, το 68,5% δηλώνει ότι χρησιμοποιεί σπανίως προφυλακτικό.
- Ως προς τον σεξουαλικό προσανατολισμό, οι ασθενείς του δείγματος είναι στην πλειοψηφία τους ετεροφυλόφιλοι (92,55%).
- Ως προς τη συχνή εναλλαγή συντρόφων, παρατηρήθηκε ότι το 63,93% των ασθενών έχουν λιγότερους των 5 συντρόφων ανά 6μηνο.
- Ως προς τη συνύπαρξη της HCV λοίμωξης με άλλα ΣΜΝ, η παρούσα εργασία έδειξε ότι η συχνότερη συλλοίμωξη είναι η HCV-HIV με ποσοστό 10,5%.
- Ως προς τη χρήση τοξικών ουσιών βρέθηκε ότι το 77,35% του δείγματος αφορά χρήστες ναρκωτικών ουσιών.
- Ως παράγοντες κινδύνου της μεικτής μεταβλητής HCV-ΣΜΝ μπορούν να χαρακτηριστούν οι παρακάτω:
 - ✓ Χρήση τοξικών ουσιών
 - ✓ Ηλικία
 - ✓ Αριθμός σεξουαλικών συντρόφων το τελευταίο 6μηνο
 - ✓ Σεξουαλικός προσανατολισμός

- Προοπτική της παρούσας διατριβής είναι να λειτουργήσει ως μία δυναμική μελέτη, η παρακολούθηση και επικαιροποίηση της οποίας μέσω του εμπλουτισμού της, να συνεισφέρει στην καταγραφή της φυσικής ιστορίας των ασθενών με HCV λοίμωξη, στην έγκαιρη θεραπευτική αντιμετώπιση και στην κατανομή των παραγόντων κινδύνου ασθενών με ηπατίτιδα C. Επιπλέον, να αποτελέσει ένα «πρώτο μέρος» πολλών εν συνεχεία επιδημιολογικών μελετών, που θα καθορίσουν εν τέλει τις κατευθυντήριες γραμμές μιας πολιτικής ιατρικής πρόληψης και ελέγχου της νόσου, με στόχο την αποφυγή ανάπτυξης και εξάπλωσής της.

Περίληψη

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), υπολογίζεται ότι 150 εκατομμύρια άτομα, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 3% του παγκόσμιου πληθυσμού, πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C, ενώ κάθε χρόνο παρουσιάζονται 3–4 εκατομμύρια νέα κρούσματα με αποτέλεσμα τη συνεχή αύξηση του πληθυσμού που βρίσκεται σε κίνδυνο ανάπτυξης κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκίνου (ΗΚΚ). Θεωρείται ότι η ηπατίτιδα C αποτελεί ένα από τα βασικότερα προβλήματα Δημόσιας Υγείας.

Οι επιστήμονες άρχισαν να εξετάζουν τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) τη δεκαετία του 1970, ενώ επιβεβαίωσαν την ύπαρξή του μόλις το 1989. Μέχρι και σήμερα δεν έχει βρεθεί εμβόλιο έναντι του ιού και έτσι η καλύτερη πρόληψη εντοπίζεται στην προσπάθεια αποφυγής μετάδοσης της νόσου, τόσο σε νοσοκομειακό επίπεδο (*ασφαλείς μεταγγίσεις και εν γένει ιατρικές πρακτικές, χρήση αποστειρωμένων συρίγγων και εργαλείων*), όσο και σε ατομικό επίπεδο (*π.χ. με τη χρήση ενδοφλεβίων ναρκωτικών χωρίς ανταλλαγή συρίγγων μεταξύ των χρηστών*).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή γίνεται προσπάθεια καταγραφής της επιδημιολογίας του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) στην Ελλάδα, καθώς δεν υπάρχουν αντίστοιχες επαρκείς επιστημονικές μελέτες στη χώρα μας.

Η συλλογή των δειγμάτων αφορά σε άτομα που προσήλθαν στο Τμήμα Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων και AIDS του Νοσοκομείου «ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΥΓΓΡΟΣ» κατά το χρονικό διάστημα από το 2004 έως και το 2012. Από αυτά απομονώθηκαν 1.543 άτομα θετικά ως προς την ηπατίτιδα C (HCV), τα στοιχεία των οποίων αποτελούν την βάση δεδομένων της μελέτης.

Σε αυτή τη βάση δεδομένων, χρησιμοποιώντας ως εργαλείο το στατιστικό μοντέλο του Pearson, επιχειρήθηκε μία στατιστική συσχέτιση με επιλεκτικούς παράγοντες-μεταβλητές, όπως χρήση τοξικών ουσιών, άλλα ΣΜΝ (Σεξουαλικά Μεταδιδόμενα Νοσήματα), ηλικία, φύλο, μορφωτικό επίπεδο, καταγωγή, σεξουαλικός προσανατολισμός, αριθμός συντρόφων, χρήση προφυλακτικού, καθώς και η παράμετρος “οικονομικός πρόσφυγας”.

Οι εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του HCV ήταν οι ανοσολογικές-ορολογικές και μοριακές μέθοδοι ρουτίνας του Εργαστηρίου Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων και AIDS του Νοσοκομείου Ανδρέας Συγγρός. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ELISA και ανοσοαποτύπωσης, ενώ για τα δείγματα που παρέμεναν αδιευκρίνιστα μετά τις παραπάνω μεθόδους, εφαρμόστηκε μοριακός προσδιορισμός.

Από την εξέταση των ευρημάτων παρατηρούμε ότι οι συχνότερα συναντώμενες ομάδες ανά κατηγορία είναι: ως προς την **χρήση τοξικών ουσιών** οι χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών, ως προς το **μορφωτικό επίπεδο** οι απόφοιτοι δημοτικού και τριτοβάθμιας εκπαίδευσης, ως προς την **καταγωγή** επικρατούν κατά πολύ οι Έλληνες, ως προς την **ηλικία** η επικρατέστερη ομάδα ανήκει στην κατηγορία ηλικίας από 31-40 ετών, ως προς το **φύλο** κυριαρχούν οι άρρενες, ως προς τον **σεξουαλικό προσανατολισμό** οι ετερόφυλοι, ως προς τον **αριθμό των συντρόφων** οι έχοντες λιγότερο των 5 συντρόφων το τελευταίο εξάμηνο, ως προς την **παρουσία συλλοιμώξεων** η πιο κοινή περίπτωση είναι αυτή με τον HIV, ως προς την **χρήση προφυλακτικού** το μεγαλύτερο ποσοστό δηλώνει σπάνια χρήση προφυλακτικού και ως προς την **μεταβλητή “οικονομικός πρόσφυγας”** μόνο ένα μικρό ποσοστό αφορά αυτή την κατηγορία.

Όσον αφορά την μικτή μεταβλητή HCV+ΣΜΝ προβαίνοντας σε **δημογραφικό χαρακτηρισμό** ως κύριο συμπέρασμα λαμβάνουμε ότι μόνο η ηλικία μπορεί να χαρακτηριστεί ως παράγων κινδύνου ενώ προβαίνοντας σε **επιδημιολογικό χαρακτηρισμό** ως κύριο συμπέρασμα λαμβάνουμε ότι η χρήση τοξικών ουσιών, ο αριθμός σεξουαλικών συντρόφων το τελευταίο εξάμηνο και ο σεξουαλικός προσανατολισμός μπορούν να χαρακτηριστούν ως παράγοντες κινδύνου.

Αποτέλεσμα της έρευνας αυτής είναι η δημιουργία μίας επιδημιολογικής βάσης ικανής να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο στα χέρια του κλινικού ιατρού, παρέχοντας του τη δυνατότητα να κατηγοριοποιεί τους πιθανούς φορείς της νόσου, ώστε να συμβάλλει στην πρόωμη πρόγνωση και στην έγκαιρη αντιμετώπισή της.

Summary

According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that 150 million people, who represent 3% of world population, suffer from chronic hepatitis C, while annually 3–4 million new cases occur, resulting to continuous increase of population under the risk of developing cirrhosis of liver and hepatocellular carcinoma (HCC, or malignant hepatoma). This is considered to be one of the fundamental issues of Public Health.

Scientists started to study the virus of Hepatitis C (HCV) in the decade of 1970, while its existence was confirmed in 1989. There is currently no available vaccine for the virus and the best prevention depends upon reducing the risk of exposure to the virus, both in health-care settings (*secure transfusions and generally medical practices, use of sterile needles and tools*) and in personal level (e.g. with the usage of i.v. drugs w/o sharing needles between users).

In the present doctoral thesis we try to record epidemiology of Hepatitis C virus (HCV) in Greece, since there are no sufficient relative scientific studies concerning our country.

The collection of samples was performed in individuals who visited the Department of Sexually Transmitted Diseases and AIDS in “ANDREAS SYNGROS” Hospital during the period from 2004 till the end of 2012. 1.543 individuals were identified as positive to Hepatitis C (HCV) and these data consist the database of the present study.

We applied Pearson statistical tool on this database and we attempted to statistically correlate with selective agents-variables, such as other STDs (Sexually Transmitted Diseases), age, sex, educational attainment, origin, sexual orientation, number of partners, usage of condom, usage of toxic substances, as well as with the parameter ‘economical refugee’.

The laboratory methods used for the detection of HCV were the routine methods used in the Sexually Transmitted Diseases and AIDS Laboratory of ‘Andreas Syngros’ Hospital, which are immuno-serological and molecular methods. In the first case ELISA and

immunoblotting methods were used, while the samples that gave uncertain result with the above mentioned methods were further proceeded with molecular detection.

Studying the findings we noted that the most frequently observed groups by category are the following: in terms of **toxic substances usage** are the users of i.v. drugs, in terms of **educational attainment** are the elementary school graduates and higher education graduates, in terms of **origin** Greek people are far more prevalent, in terms of **age** the most popular group belongs to age category from 31 to 40 years old, in terms of **gender** men prevail, in terms of **sexual orientation** are the heterosexuals, in terms of **number of partners** are the ones with less than 5 partners during the last six months, in terms of **coinfections presence** the most common case is this of HIV, in terms of **condom usage** the highest percentage declares rare usage of condom and finally, in terms of the **parameter 'economical refugee'**, only a small percentage belongs in this category.

With respect to the joined variables HCV+STD, assessing a **demographic characterization**, our main conclusion was that only the parameter of age is representing a risk factor, while assessing an **epidemiological characterization**, our main conclusion was that the usage of toxic substances, the number of partners during the last six months and sexual orientation definitely are risk factors.

The result of the present study is the accomplishment of an epidemiological study which can be used as a tool for clinicians, enabling them to categorize the potential carriers of the disease and contribute to early prognosis and timely treatment.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

• ΕΛΛΗΝΙΚΗ

1. Μικροβιολογία, Καραγκούνη-Κύρτσου Αμαλία (1999), Πανεπιστήμιο Αθηνών, ISBN: 9603512044, Εκδόσεις Σταμούλη.
2. Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας (2006), Alberts Bray Hopkin Johnson Lewis Raff Roberts Walter, ISBN: 2000307419, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη.
3. Επιδημιολογική καταγραφή της λοίμωξης από τους ιούς HCV, HIV1-2, HTLV1/2 σε αιμοδοτικό πληθυσμό (2011). Βασίλης Ανδριώτης, Μιχαήλ Τζιλιάνος, Ειρήνη Νασούλα, Χρύσα Στάβερη, Γεώργιος Σαγιάς *Ιατρικά Χρονικά Βορειοδυτικής Ελλάδος*, Τόμος 7, Τεύχος 2.
4. Οικονομική Προσέγγιση της Ηπατίτιδας C στην Ελλάδα (2008). Υφαντόπουλος Γ, Παπαγιαννοπούλου Β, Καλίγερος Κ, Μανωλακόπουλος Σ, Χαρός Α, Κοσκίνας Ι, *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, Τόμος 25.

• ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

1. WHO. Hepatitis C. Weekly Epidemiol Record 2000; Fact Sheet 164, updated July 2013.
2. Global surveillance and control of hepatitis C. (1999). Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat*; 6:35-47.
3. Reed KE, Rice CM. (2000). Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*; 242:55-84.
4. Mast EE, Alter MJ (1993). *Seminars in virology*; 4:273-283.
5. Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski, J, Carrington M, Thomas DL. (2002). HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *J Virol*; 76:4792-7.

6. Lindenbach BD, Rice CM. (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 18; 436 (7053):933-8.
7. Rice, C. M. (2003). HCV life cycle and targets for drug development. *Hepatitis Annual Update*, 123–142.
8. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*; 39(1):5-19.
9. Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. (1994). Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol*; 68(8):5045-55.
10. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol.* ; 67(6):3338-44.
11. Roussel J, Pillez A, Montpellier C, Duverlie G, Cahour A, Dubuisson J, Wychowski C. (2003). Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J Gen Virol*, 84:1751-1759;
12. Zhenming Xu, Jinah Choi, T.S.Benedict Yen, Wen Lu, Anne Strohecker, Sugantha Govindarajan, David Chien, Mark J. Selby and Jing-hsiung Ou (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *The EMBO Journal* 20, 3840 – 3848.
13. Ratna B. Ray and Ranjit Ray (2001). Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 202, Issue 2, pages 149–156.
14. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* ; 68:3631–3641
15. Basu, A., K. Meyer, R. B. Ray, and R. Ray. (2001). Hepatitis C virus core protein modulates the interferon-induced transacting factors of JAK/Stat signaling pathway but does not affect the activation of IRF-1 or 561 genes. *Virology*, 288: 379–390.

16. McLauchlan (2000). Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *Journal of Viral Hepatitis*; Volume 7, Issue 1, pages 2–14.
17. Goffard, A., and J. Dubuisson (2003). Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie*, 85:295-301.
18. Anne Op De Beeck, Cécile Voisset, Birke Bartosch, Yann Ciczora, Laurence Cocquerel, Zhenyong Keck, Steven Foung, François-Loïc Cosset, and Jean Dubuisson (2004). Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *J. Virol.*; vol. 78 no. 6 2994-3002.
19. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*. Jul 2; 285 (5424):107-10.
20. Masayuki Kurosaki, Nobuyuki Enomoto, Fumiaki Marumo, Chifumi Sato M. D. (1993). Rapid sequence variation of the hypervariable region of hepatitis C virus during the course of chronic infection. *Hepatology*. Volume 18, Issue 6, pages 1293–1299.
21. Cooper S, Erickson A L, Adams EJ, (1999). Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*; 10:439-49.
22. Lechner F, Gruener NH, Urbani S, et al (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*; 191:1499–512. 199.
23. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* (6): 578-82.
24. Love RA; Parge HE; Wickersham JA (1996). The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site, *Cell*, Vol: 87:331-42.
25. Lars Erdtmann, Nathalie Franck, Hervé Lerat, Jacques Le Seyec, David Gilot, Isabelle Cannie, Philippe Gripon, Urszula Hibner and Christiane Guguen-

- Guillouzo (2003). The Hepatitis C Virus NS2 Protein Is an Inhibitor of CIDE-B-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem*; 78: 18256-18264
26. Dumoulin, F. L., A. von dem Bussche, J. Li, L. Khamzina, J. R. Wands, T. Sauerbruch, and U. Spengler. (2003). Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*; 305:260-266.
 27. Rho J, Choi S, Seong YR, Choi J, Im DS. (2001). The arginine-1493 residue in QRRGRTGR1493G motif IV of the hepatitis C virus NS3 helicase domain is essential for NS3 protein methylation by the protein arginine methyltransferase 1. *J Virol.* ; 75(17):8031-44.
 28. Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J. (1995). C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 4; 215(1):160-6.
 29. Tai. C. L., W. K. Chi., D. S. Chen and L. H. Hwang. (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.*; 70:8477-8484.
 30. Heilek. G. M and M. G. Peterson (1997). A point mutation abolishes the helicase but not the nucleoside triphosphatase activity of hepatitis C virus NS3 protein. *J. Virol.* 71:6264-6266.
 31. Ishido. S and H. hotta (1998). Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *FEBS Lett.* 438:258-262.
 32. Borowski. P., J. S. Zur Wiesch., K. Resch., H. Feucht., R. Laufs and H. Schmitz (1999). Protein kinase C recognizes the protein kinase A-binding motif of non-structural pprotein 3 of hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.*; 274:30722-30728.
 33. Borowski. P., R. Kuhl., R. Laufs., W. J. Schulze zur and M.Heiland (1999). Identification and characterization of a histone binding site of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus. *J. Clin. Virol*; 13:61-69.
 34. Hugle. T., F. Fehrmann., E. Bieck., m. Kohara., H. G krausslich., M. Rice., H. E. Blum and D. Moradpour (2001). The hepatitis C virus nonstructural protein

- 4B is an integral endoplasmatic reticulum membrane protein. *Virology*. 284: 70-81.
35. Asabe. S. I., Y. Tanji., S. Satoh., T. Kaneko., K. Kimura and K. Shimotohno (1997). The N-terminal region of hepatitis C virus encoded is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J. Virol.*; 71:790-796.
 36. Florese. R. H., M. Nagano-fujii., Y. Iwanaga., r. hidajat and H. Hotta (2002). Inhibition of protein synthesis by the non structural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res*; 90:119-131.
 37. Kato. J., N. Kato., H. Yoshida., S. K ono-Nita., Y. Shiratori and M. Omata (2002). Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins supress translation in vivo. *J. Med. Virol.*; 66: 187-199.
 38. Moradpour. D., V. Brass., E. Bieck., P. Friebe., R. Gosert., H. E. blum., R. Bartenschlager., F. Penin and V. Lohmann (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis c virus RNA replication. *J. Virol.*; 78:13278-13284.
 39. Lohmannn. V., F. Korner., U. herian and R. Bartenshlager (1997). Biochemical properties of hepatitis C virus NS5A RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.*; 71: 8416-8428.
 40. Kim. M., H. Kim., S. P. Cho and M. K. Min (2002). Template requirements for denovo RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase on the viral X RNA. *J. Virol.*; 76:6944-6956.
 41. MacDonald. A and M. Harris (2004). Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *L. Gen. Virol.*; 85:2485-2502.
 42. Tellinghuisen. T. L., J. Marcottigiano., A. E. Gorbalenya and C.M. Rice (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is azinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.*; 19; 279: 48576-48587.
 43. Majumder. M., A. K. Ghosh., R. Steele., R. ray and R.B Ray (2001). Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf gene expression in a p53-dependent manner. *J. Virol*; 75:1401-1407.

44. Street. A., A. Macdonald, K. Crowder and M. Harris (2004). The hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival cascade. *J. Biol. Chem*; 279. 12232-12241.
45. Gale. M., Jr., M. J. Korth., NJ. M Tang. S.L. Tan., D. A. Hopkins., T. E. Dever., S.L. Polyak., D. R. Gretch and M. G. Katze (1997). Evidence that hepatitis C resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*; 230: 217-227.
46. Tan. S. L and M.G. Katze (2001). How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology*; 284:1-12.
47. Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S. & Shimotohno, K. (1991). Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 175, 220-228.
48. Tang S, Collier AJ, Elliott RM (1999). Alterations to both the primary and predicted secondary structure of stem-loop IIIc of the hepatitis C virus 1b 5' untranslated region (5'UTR) lead to mutants severely defective in translation which cannot be complemented in trans by the wildtype 5'UTR sequence. *J Virol*; 73: 2359-64.
49. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*; 285: 110.
50. Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K. (1999). Differences in hypervariable region I quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. *Hepatology*; 29:217-22.
51. Domingo, E., and Holland, JJ. (1988). High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication systems, p. 3–36. In Domingo, E. Holland, JJ. Ahlquist, P Eds RNA Genetics, Vol 3 Boca Raton, FL: CRC, pp. 3-36.
52. Holland, JJ, J C de la Torre, and D. Steinhauer (1992). RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176:1–20

53. Domingo E. (1996). Biological Significance of Viral Quasispecies. *Viral Hepatitis Reviews*; 2:247-261.
54. Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. (2000). Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol*; 74: 2046-51.
55. Eric E. Mast, Miriam J. Alter (1993). Epidemiology of viral hepatitis: an overview. *Seminars in Virology*. Volume 4, Issue 5, Pages 273–283.
56. Alter MJ. (1997). Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*; 26 [Suppl 1]: 62-65.
57. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*; 282: 938-41.
58. Wasley A, Alter MJ. (2000). Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.*; 20(1):1-16.
59. Georg M. Lauer, M.D., and Bruce D. Walker, M.D. (2001). Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* 2001; 345:41-52.
60. Andriotis B, Tzilianos M., Nasoula E., Staveris C., Sagias G. (2011). Epidemiological record of infection from viruses, HCV, HIV1-2, HTLV1/2 in blood donors' population. Blood Bank General Hospital of Corfu.
61. Raptopoulou, M, Touloumi, G, Tzourmakliotis, D, Nikolopoulou, G, Dimopoulou, M, Giannoulis, G, Vasiliadis, T, Manolakopoulos, S. (2011). Significant epidemiological changes in chronic hepatitis C infection: results of the nationwide HEPNET-GREECE cohort study. *Hippokratia*, 15 (1), p.26-31.
62. Roudot – Thoraval F, Bastic A, Pawlotsky JM, Dhumeaux D. (1997). Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus – related liver disease: a French survey of 6,664 patients. *Hepatology*; 26:485-90.
63. Kiyosawa K, Furuta S. (1993). Transmission and prevention of hepatitis C infection. Fourth International Symposium of HCV. Tokyo, Japan, May 7-9. Program and Abstracts p. 30.

64. Sagnelli E, Gaeta GB, Felaco FM, et al. (1997). Hepatitis C virus infection in households of anti-HCV chronic carriers in Italy: a multicentre case-control study. *Infection*; 25:346-9.
65. Katsoulifou A, Paraskevis D, Kalapothaki V, et al. (1999). Molecular epidemiology of a hepatitis C virus outbreak in a haemodialysis unit: Multicentre Haemodialysis Cohort Study on Viral Hepatitis. *Heprol Dial Transplant*; 14:1188-94.
66. Esteban JI, Gomez J, Martell M, et al. (1996). Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N Engl J Med*; 334:555-60.
67. Hernandez ME, Bruguera M, Puyuelo T, Barrera JM, Sanchez Tapias JM, Rodes J. (1992). Risk of needle-stick injuries in the transmission of hepatitis C virus in hospital personnel. *J Hepatol*; 16:56-8.
68. Ross RS, Viazov S, Gross T, Hofmann F, Seipp H-M, Roggendorf M. (2000). Transmission of hepatitis C virus from a patient to an anesthesiology assistant to five patients. *N Engl J Med*; 343:1851-4.
69. Thomas DL, Villano SA, Riester KA, et al. (1998). Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1 – infected mothers: Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis*; 177:1480-8.
70. Mitsui T, Iwano K, Masuko K, et al. (1992). Hepatitis C virus infection in medical personnel after needle-stick accident. *Hepatology*; 16:1109-14.
71. Eyster ME, Alter HJ, Aledort LM, Quan S, Hatzakis A, Goedert JJ. (1991). Heterosexual cotransmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med*; 115:764-8.
72. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement: management of hepatitis C. (2002). *Hepatology*; 26: Suppl1: 2S-10S.
73. Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, et al. (1996). Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*; 334:1691-6.

74. Vasquez C, Lioznov D, Nikolaenko S, Yatsishin S, Lesnikova D, Cox D, Pankovich J, Rosenes R, Wobeser W, Cooper C (2013). Gender disparities in HIV risk behavior and access to health care in St. Petersburg, Russia. *St Petersburg-CIHR Canadian HIV Trials Network Collaboration*: 27(5):304-10.
75. Cazzagon N, Trevisani F, Maddalo G, Giacomini A, Vanin V, Pozzan C, Poggio PD, Rapaccini G, Nolfo AM, Benvegnù L, Zoli M, Borzio F, Giannini EG, Caturelli E, Chiamonte M, Foschi FG, Cabibbo G, Felder M, Ciccarese F, Missale G, Baroni GS, Morisco F, Pecorelli A, Farinati F. (2013). Rise and fall of HCV-related hepatocellular carcinoma in Italy: a long-term survey from the ITA.LI.CA centres. *Italian Liver Cancer (ITA.LI.CA) Group*:33(9):1420-7.
76. Jordier F, Deligny ML, Barré R, De Micco P, Cantaloube JF. (2013). Evidence for two phylogenetic clusters within hepatitis C virus (HCV) genotype 2 inferred from analysis of complete coding sequences of 15 HCV strains. *J Med Virol*; 85(10):1754-64.
77. Stephen Corson, David Greenhalgh, Avril Taylor, Norah Palmateer, David Goldberg, Sharon Hutchinson (2013). Modelling the prevalence of HCV amongst people who inject drugs: An investigation into the risks associated with injecting paraphernalia sharing. *Drug and Alcohol Dependence*: Volume 133, Issue 1, Pages 172–179.
78. Gatselis, Nikolaos K. Rigopoulou, Eirini, Stefos, Aggelos, Kardasi, Maria, Dalekos, Georgios N. (2007). Risk factors associated with HCV infection in semi-rural areas of central Greece. *European Journal of Internal Medicine*, 18 (1), p.48-55.
79. Katsoulidou A, Sypsa V, Tassopoulos NC, Boletis J, Karafoulidou A, Ketikoglou I, Tsantoulas D, Vafiadi I, Hatzis G, Skoutelis A, Akriviadis E, Vasiliadis T, Kitis G, Magiorkinis G, 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; 13 (1):19-27.

80. Barbieri Victoria, Marilú, da Silva Victoria, Flamir, Torres, Kátia Luz, Kashima, Simone, Covas, Dimas Tadeu, Malheiro, Adriana (2010). Epidemiology of HIV/HCV coinfection in patients cared for at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases Volume 14*, Issue 2, Pages 135–140.
81. Lee, Krystal C.K., Lim, Wilina W.L., Lee, Shui Shan (2008). High prevalence of HCV in a cohort of injectors on methadone substitution treatment. *Journal of Clinical Virology*, 41 (4), p.297-300.
82. Manesis EK, Papatheodoridis GV, Touloumi G, Karafoulidou A, Ketikoglou J, Kitis GE, Antoniou A, Kanatakis S, Koutsounas SJ, Vafiadis I. (2009). Natural course of treated and untreated chronic HCV infection: results of the nationwide Hepnet. Greece cohort study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 29 (10), p.1121-1130, HEPNET.Greece Cohort Study. 15; 29(10):1121-30.
83. Rigopoulou, Eirini I, Stefanidis, Ioannis, Liaskos, Christos, Zervou, Eleftheria K, Rizos, Christos, Mina, Paraskevi, Zachou, Kalliopi, Dalekos, Georgios N. (2005). HCV-RNA qualitative assay based on transcription mediated amplification improves the detection of hepatitis C virus infection in patients on hemodialysis: results from five hemodialysis units in central Greece. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 34 (1), p.81-85.
84. Zervou, E.K, Boumba, D.S, Liaskos, Ch, Georgiadou, S, Tsianos, E.V, Dalekos G.N. (2003). Low prevalence of HCV, HIV, and HTLV-I/II infection markers in northwestern Greece: results of a 3-year prospective donor study (1995–1997). *European Journal of Internal Medicine*, 14 (1), p.39-44.
85. Elefsiniotis, Ioannis S, Hero, Brokalaki, Mariolis, Anargiros, Pantazis, Konstantinos D, Fotos, Nikolaos V, Ketikoglou, Ioannis, Saroglou, George (2005). Serological profile of HBV infection and liver histopathology among injecting drug users with chronic HCV infection in Greece. *European Journal of Internal Medicine*, 16 (7), p.496-500.

86. Sypsa, V, Touloumi, G, Tassopoulos, N C, Ketikoglou, I, Vafiadis, I, Hatzis, G Tsantoulas, D, 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), p.366-374.
87. Savvas, S P, Koskinas, J, Sinani, C, Hadziyannis, A, Spanou, F, Hadziyannis, S J. (2005). Changes in epidemiological patterns of HCV infection and their impact on liver disease over the last 20 years in Greece. *Journal of viral hepatitis*, 12 (5), p.551-557.
88. Dalekos, G N, Zervou, E, Merkouropoulos, M H, Tsianos, E V. (1996). Prevalence of hepatitis B and C viruses' infection in chronic alcoholics with or without liver disease in Ioannina, Greece: low incidence of HCV infection. *European journal of epidemiology*, 12 (1), p.21-25.
89. Pneumaticos, Spyros G, Savvidou, Christiana, Tsiakalos, Aristotelis, Sipsas, Nikolaos V. (2012). Seroprevalence of HIV, HBV and HCV in orthopaedic patients at a tertiary hospital in Greece. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 22 (1), p.57-60.
90. Nelson, Paul K, Mathers, Bradley M, Cowie, Benjamin, Hagan, Holly, Des Jarlais, Don, Horyniak, Danielle, Degenhardt, Louisa (2011). Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet*, 378 (9791), p.571-583.
91. Karatapanis, Stylianos, Tsoplou, Panagiota, Papastergiou, Vasilios, Vasiageorgi, Aggeliki, Stampori, Maria, Saitis, Ioannis, Tsitsopoulos, Eustathios, Goulis, Ioannis (2012). Hepatitis C virus genotyping in Greece: unexpected high prevalence of genotype 5a in a Greek island. *Journal of medical virology*, 84 (2), p.223-228.
92. Stamouli, Marilena, Panagiotou, Ioanna, Kairis, Dimitrios, Michopoulou, Athina, Skliris, Anastasios, Totos, Grigorios (2012). Genotype distribution in chronic hepatitis C patients in Greece. *Clinical laboratory*, 58 (1-2), p.173-176.

93. Guo W, Qu SQ, Ding ZW, Yan RX, Li DM, Wang L, Wang L. (2010). Situations and trends of HIV and syphilis infections among drug users in China, 1995 – 2009. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*, 31 (6), p.666-669.
94. Shrestha, Ashish Chandra, Ghimire, Prakash, Tiwari, Bishnu Raj, Rajkarnikar, Manita (2012). Co-infection rate of HIV, HBV and Syphilis among HCV seropositive identified blood donors in Kathmandu, Nepal. *Infection ecology & epidemiology*, 2.
95. Hussain, T., Kulshreshtha, K.K, Sinha, Shikha, Yadav, V.S.,Katoch, V.M. (2006). HIV, HBV, HCV, and syphilis co-infections among patients attending the STD clinics of district hospitals in Northern India. *International Journal of Infectious Diseases*, 10 (5), p.358-363.
96. Klevens, R Monina, Hu, Dale J, Jiles, Ruth, Holmberg, Scott D (2012). Evolving epidemiology of hepatitis C virus in the United States. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55 Supplement 1, p.S3-S9.
97. Miriam J Alter. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, 7; 13(17): 2436-2441.
98. Uhanova J, Tata RB, Tataryn DJ, Minuk GY (2012). A population study of the epidemiology of hepatitis C in a North American population. *J Hepatol*; 57 (4):736-42.