

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Gregor ZUPAN

**RAZPOREDITEV GENOTIPOV VIRUSA HEPATITISA C V
SLOVENIJI V LETIH 2003 - 2006**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DISTRIBUTION OF HEPATITIS C GENOTYPES IN SLOVENIA
FROM 2003 TO 2006**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med. in za recenzenta prof. dr. Maria Poljaka, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Recenzent: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Katja Seme

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Mario Poljak

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Gregor Zupan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 578.7: 616.36 (043) = 163.6
- KG virusi/virus hepatitisa C/genotipi/razporeditev genotipov/prevalenca v Sloveniji
- AV ZUPAN, Gregor
- SA SEME, Katja (mentorica)/POLJAK, Mario (recenzent)
- KZ SI – 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2009
- IN RAZPOREDITEV GENOTIPOV VIRUSA HEPATITISA C V SLOVENIJI V LETIH 2003-2006
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 54 str., 6 pregl., 6 sl., 87 vir.
- IJ sl
- IJ sl/en
- AI Virus hepatitisa C (HCV) je eden najpomembnejših povzročiteljev vnetja jeter. Pri večini okužb s HCV bolezen preide v kronično obliko, kar lahko privede do jetrne ciroze ali hepatocelularnega karcinoma. HCV se prenaša preko okužene krvi in krvnih pripravkov. Dokazovanje okužbe s HCV poteka s posrednimi in neposrednimi metodami. S posrednimi metodami dokazujemo prisotnost specifičnih protiteles proti HCV, medtem ko z neposrednimi metodami dokazujemo HCV RNA. Namen naše raziskave je bil ugotoviti kakšna je bila porazdelitev genotipov HCV v Sloveniji, v obdobju od 2003 do 2006. Poleg tega smo želeli raziskati povezave med različnimi genotipi HCV in načini okužbe ter ugotoviti spremembe v njihovih deležih v primerjavi s prejšnjim desetletjem. V raziskavo smo vključili 891 oseb, pri katerih so bila v opazovanem obdobju na novo dokazana protitelesa anti-HCV. Ugotovljena povprečna starost vseh okuženih s HCV v navedenem obdobju v Sloveniji je bila 35,6 let. 65,4 % vseh okuženih je bilo moških s povprečno starostjo $34,7 \pm 13,2$ let, 33,4 % je bilo žensk s povprečno starostjo $37,4 \pm 17,1$ let. Največ oseb okuženih s HCV v Sloveniji je bilo odkritih v starostni skupini 21-30 let (45,8 %). Intravenska uporaba drog je bila daleč najbolj pogost dejavnik tveganja za okužbo s HCV v Sloveniji s 344 osebami (38,6 %). Pri 232 osebah (52,4 %) je bil ugotovljen genotip HCV 1, pri 194 osebah (43,8 %) je bil ugotovljen genotip 3, pri 15 osebah (3,4 %) genotip 2 in pri 2 osebah genotip 4 (0,5 %). Osebe okužene z genotipom 1 so bile statistično pomembno starejše ($39,1 \pm 14,8$ let) od oseb okuženih z genotipom 3 ($29,5 \pm 7,9$ let) ($p < 0,00001$). Ugotovili smo, da se je delež genotipa HCV 3 v prvih dveh letih opazovanega obdobja po pričakovanjih povečal, vendar je nato v zadnjih dveh letih nepričakovano padel. Delež genotipa HCV 1 pa je imel ravno obraten trend, se pravi, da je v prvih dveh letih upadel nato pa ponovno zrasel.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 578.7: 616.36 (043) = 163.6
- CX viruses/ hepatitis C virus/genotypes/distribution of genotypes/prevelence in Slovenia
- AU ZUPAN, Gregor
- AA SEME, Katja (supervisor)/POLJAK, Mario (reviewer)
- PP SI – 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2009
- TI DISTRIBUTION OF HEPATITIS C GENOTYPES IN SLOVENIA FROM 2003 TO 2006
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 54 p., 6 tab., 6 fig., 87 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The hepatitis C virus (HCV) is one of the leading causes for chronic liver disease. HCV is transmitted by infectious blood or blood-derived products. Diagnosis of HCV infection is based on indirect and direct virological tests. Indirect tests detect antibodies against HCV, while direct tests detect viral RNA. The aim of our study was to determine the distribution of HCV genotypes in Slovenia between 2003 and 2006. We also wanted to research the correlation between various HCV genotypes and routes of infection and find out changes in their shares comparing to past decade. There were 891 anti-HCV positive individuals included in our research. Average age of all individuals included was 35,6 years, 65,4 % were men with average age $34,7 \pm 17,1$ years and 33,4 % were women with average age $37,4 \pm 17,1$ years. 45,8 % of infected individuals were between 21 and 30 years old. The most common risk factor was found to be intravenous drug abuse with 344 individuals (38,6 %). HCV genotype 1 was predominant (52,4 %) followed by genotype 3 (43,8 %), genotype 2 (3,4 %) and genotype 4 (0,5 %). Individuals infected with genotype 1 were statistically much older ($39,1 \pm 14,8$ years) than individuals infected with genotype 3 ($29,5 \pm 7,9$ years) ($p < 0,00001$). During the four year period the proportion of genotype 3 increased in the first two years but then fell to the starting point. On the other hand the proportion of HCV genotype 1 fell in the first year of studied period but then increased gradually.

	KAZALO VSEBINE	STR.
	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VII
	KAZALO SLIK	VIII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	ODKRITJE IN TAKSONOMSKA UVRSTITEV	3
2.2	ZGRADBA HCV	3
2.3	GENETSKA RAZNOLIKOST HCV	5
2.4	ZEMLJEPISNA RAZPOREDITEV	6
2.5	NAČINI PRENOSA HCV	8
2.5.1	Prenos okužbe s HCV pri intravenskem uživanju drog	8
2.5.2	Prenos okužbe s HCV pri transfuziji krvi in krvnih pripravkov	8
2.5.3	Prenos okužbe s HCV pri presaditvi organov	9
2.5.4	Prenos okužbe s HCV pri hemodializi	9
2.5.5	Ostali načini prenosa okužbe s HCV	10
2.6	POTEK OKUŽBE	10
2.7	DIAGNOSTIKA HEPATITISA C	12
2.8	RAZPOREDITEV HCV V SLOVENIJI DO LETA 2003	14
3	MATERIAL IN METODE	16
3.1	BOLNIKI	16
3.2	GENOTIPIZACIJA	17
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	19
4	REZULTATI	20
4.1	EPIDEMIOLOŠKE ZNAČILNOSTI OKUŽBE S HCV V SLOVENIJI	20
4.2	RAZPOREDITEV GENOTIPOV HCV V SLOVENIJI	22
4.3	RAZPOREDITEV GENOTIPOV HCV GLEDE NA STAROST BOLNIKOV	22

4.4	RAZPOREDITEV GENOTIPOV HCV GLEDE NA DEJAVNIKE TVEGANJA OKUŽBE	24
4.5	SPREMEMBE V RAZPOREDITVI GENOTIPOV HCV V OPAZOVANEM OBDOBJU	25
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	27
5.1	RAZPOREDITEV GENOTIPOV HCV V SLOVENIJI	28
5.2	SPREMEMBE V RAZPOREDITVI GENOTIPOV HCV V OPAZOVANEM OBDOBJU	30
5.3	SKLEPI	32
6	POVZETEK	33
7	VIRI	35

	KAZALO PREGLEDNIC	STR.
Preglednica 1:	Število novo odkritih oseb okuženih s HCV v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete v Ljubljani v obdobju od 1.1.2003 do 31.12.2006.	20
Preglednica 2:	Dejavniki tveganja okužbe s HCV v Sloveniji v letih 2003 - 2006	21
Preglednica 3:	Razporeditev genotipov HCV v Sloveniji v letih 2003 - 2006.	32
Preglednica 4:	Število in deleži genotipov 1, 2, 3 in 4 po starostnih skupinah v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=443)	23
Preglednica 5:	Povprečna starost bolnikov okuženih z različnimi genotipi HCV v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=443).	23
Preglednica 6:	Razporeditev genotipov HCV glede na verjeten način okužbe s HCV v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=247).	24

	KAZALO SLIK	STR.
Slika 1:	Prikaz zgradbe HCV in organizacije njegovega genoma (Dubuisson, 2007).	4
Slika 2:	Prikaz pridobljenih podatkov pri osebah okuženih s HCV obravnavanih v naši raziskavi v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=891)	17
Slika 3:	Nitrocelulozna membrana v obliki traku z vezanimi DNA lovkami, specifičnimi za posamezne genotipe HCV.	18
Slika 4:	Starostne skupine oseb okuženih s HCV v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=891).	21
Slika 5:	Delež posameznih genotipov HCV v opazovanem obdobju v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=443).	25
Slika 6:	Trendi rasti in upadanja deležev genotipov HCV v v Sloveniji v letih 2003 – 2006.	26

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALT	alanin-amino transferaza
C	beljakovine virusne sredice
DNA	deoksiribonukleinsk kislina
E	beljakovine virusne ovojnice
EIA	encimsko imunski presejalni test
HCV	Virus hepatitisa C
HVR	hipervariabilne regije
IVUD	intravenski uporabniki drog
NAT	nucleic acid techniques
NS	nestrukturne beljakovine
ORF	bralni okvir nukleinske kisline
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
RNA	ribonukleinska kislina
TMA	pomnoževanje s pomočjo transkripcije

1 UVOD

Virus hepatitisa C (HCV, angl. hepatitis C virus) je eden najpogostejših povzročiteljev vnetja jeter. V veliki meri okužbe s HCV preidejo v kronično obliko, ki se lahko razvije v cirozo jeter ali hepatocelularni karcinom (Boyer in sod., 2002). Tudi do 80 % okužb se lahko razvije v kronično okužbo (Morice in sod., 2006, Haushofer in sod., 2001). Posebnost oziroma nevarnost HCV se kaže v dolgotrajni nesimptomatični okužbi, ki se skozi leta v visokem deležu razvije v smrtno bolezen kroničnega hepatitisa C (Seeff, 1997).

Svetovna zdravstvena organizacija ocenjuje, da je okužene približno 3 % svetovne populacije, deleži okuženih pa so lahko od države do države različni (Gérard in sod. 2005). Tako naj bi bila prekuženost v Afriki 5,3 %, v vzhodnem Sredozemlju 4,6 %, v zahodnem Pacifiku 3,9 %, v obeh Amerikah 1,7 % in v Evropi 1,0 %, razlike znotraj teh regij pa lahko tudi zelo variirajo (Sy in sod., 2006, Schröter in sod., 2002).

Izolate HCV razvrščamo v 6 genotipov, vsakega od njih pa v več podtipov. Geografsko so genotipi in podtipi HCV različno razporejeni, tako so nekateri omejeni na določene regije, nekatere pa najdemo po celem svetu. Tako na primer podtipa 1a in 1b prevladujeta v Evropi, ZDA in Avstraliji, 1b je prevladujoči podtip na Japonskem, Kitajskem in v Rusiji, medtem ko je v Egiptu najbolj razširjen podtip 4a. Podtip 5a je odgovoren za 50 % okužb v Južni Afriki, v centralni Afriki prevladuje genotip 4, genotipa 3 in 6 pa sta glavna krivca v jugovzhodni Aziji (Bourliere in sod., 2002). Od vseh genotipov in podtipov so 1a, 1b, 2a, 2b bolj ali manj prisotni po celem svetu, medtem ko sta na primer 5a in 6a bolj geografsko omejena (Simmonds in sod., 1996).

Oprelitev genotipa HCV je pomembna za epidemiološke raziskave, za razjasnitev načina prenosa in širjenja okužbe ter za določitev sheme poteka in trajanja protivirusnega zdravljenja (Zein in sod., 1996). Določanje genotipa je pomembno tudi za ocenjevanje verjetnosti odziva pacienta na različna zdravila. Ponavadi je odziv na terapijo pri osebah okuženih z genotipoma 1 in 4 slabši, kot odziv oseb okuženih z 2 ali 3 (Bourliere in sod., 2002). Zato naj bi bila opredelitev genotipa HCV v kombinaciji z določanjem količine virusnega genoma ena od ključnih preiskav pred odločitvijo o protivirusnem zdravljenju (Di Bisceglie in sod., 2002). V mnogih državah po celem svetu se porazdelitev genotipov

spreminja glede na starost bolnikov. Predvsem prihaja do upada števila novih okužb s podtipom 1b in do povečanja števila novih okužb z genotipom 3 in podtipom 1a (Bourliere in sod., 2002). Z analizami podatkov o bolnikih so raziskovalci prišli do ugotovitve, da je to spreminjanje posledica predvsem sprememb prevladujočih načinov prenosa HCV (Vrhovac, 2003).

1.1 NAMEN DELA

Namen naše raziskave je ugotoviti kakšna je razporeditev genotipov/podtipov HCV v Sloveniji v obdobju od 2003 do 2006. Poleg tega želimo raziskati povezave med različnimi genotipi/podtipi HCV, načini okužbe, starostjo in spolom ter ugotoviti spremembe v njihovih deležih v primerjavi s prejšnjim desetletjem.

Pričakujemo, da se bo delež HCV genotipa 3, ki je prisoten predvsem pri okuženih intravenskih uživalcih drog še povečal, saj je zadnje desetletje rasel skupaj z deležem intravenskih uživalcev drog med novoodkritimi bolniki s hepatitisom C.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ODKRITJE IN TAKSONOMSKA UVRSTITEV

HCV je prvi virus pri katerem so znanstveniki najprej poznali genom in šele čez nekaj let je sledila osamitev (Alter in sod., 1990). Prve serološke teste, ki so omogočali dokazovanje protiteles proti virusu hepatitisa B so razvili v začetku sedemdesetih let prejšnjega stoletja in s tem dali možnost izločevanja okužene krvi za transfuzijo. Ker pa kljub tem testom skupno število potransfuzijskih hepatitisov ni upadlo, so znanstveniki posumili na novi virus, ki se je tem testom spretno izognil (Alter in sod., 1990). Tako so v zgodnjih 80-ih letih prejšnjega stoletja uspeli osamiti celotno nukleinsko kislino iz plazme šimpanza, okuženega s koncentratom faktorja VIII, ki je domnevno vseboval povzročitelja ne-A, ne-B hepatitisa (Choo in sod., 1989). Pri teh poskusnih šimpanzih so nato uspeli opazovati virusne delce v jetrnih celicah in ostale biokemijske ter histopatološke spremembe, ki so značilne za hepatitis (Shimizu in sod., 1996).

HCV danes uvrščamo v družino *Flaviviridae*, ki vsebuje rodove *Flavivirus*, *Pestivirus* in *Hepacivirus*, v katerega spada tudi HCV (Leyssen in sod., 2000). Pred uvrstitvijo so z analizami nukleotidnega zaporedja RNA molekule ugotovili podobnost s pestivirusi in flavivirusi (Purcell, 1997).

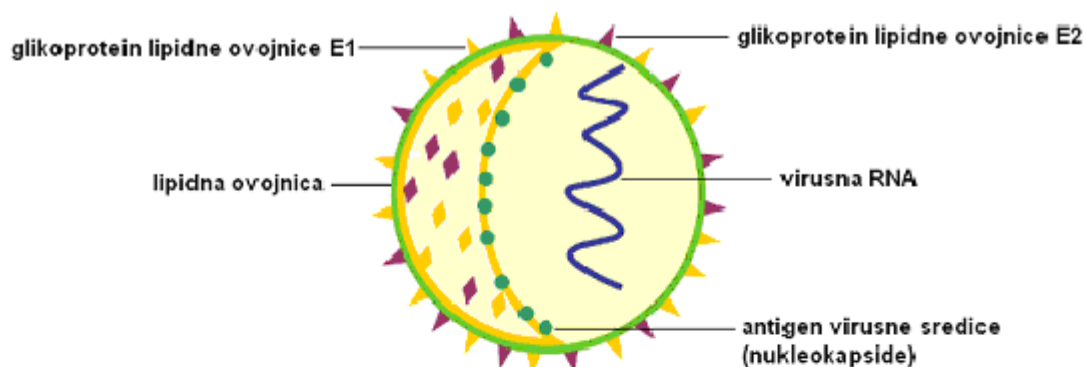
2.2 ZGRADBA HCV

Virion HCV je kroglaste oblike s premerom 50 do 70 nm, v sredici, ki jo obdaja lipoproteinska ovojnica, ima RNA molekulo in beljakovino, ki skupaj tvorita nukleokapsido. Nukleokapsida HCV je ikozaedrična, obdana je z lipidno ovojnico, ki je prekrita s površinskimi izrastki peplomeri (Li in sod., 1995).

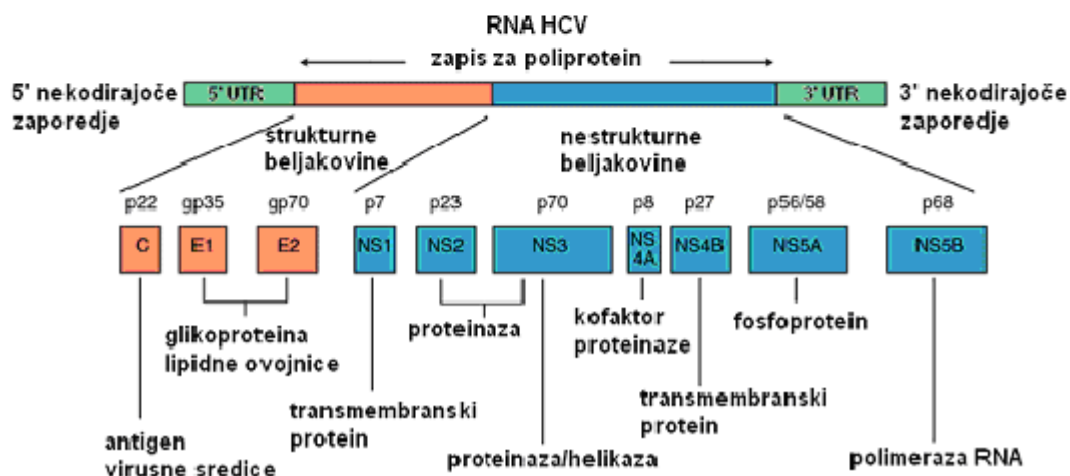
Virusni genom je pozitivno orientirana enojnovijačna RNA molekula dolžine približno 9400 baz, za katero je značilna visoka genetska raznolikost (Bourliere in sod., 2002). Molekula RNA je nesegmentirana in kodira en sam poliprotein s približno 3000 aminokislinami (Cantaloube in sod., 2005). Ima en sam bralni okvir (angl. open reading frame, ORF), ki ga z obeh koncev obdajata nekodirajoči regiji. ORF vsebuje področja, ki kodirajo strukturne

beljakovine virusne sredice in ovojnice in nestrukturne beljakovine, ki imajo vlogo pri podvojevanju in cepitvi virusnega poliproteina. Poliprotein razcepijo gostiteljske in virusne proteaze v endoplazmatskem retikulumu na približno deset beljakovin, kot je prikazano na sliki 1 (De Francesco, 1999).

a) struktura HCV



b) organizacija genoma HCV



Slika 1: Prikaz zgradbe HCV in organizacije njegovega genoma (Dubuisson, 2007).

Strukturne beljakovine sestojijo iz beljakovine virusne sredice (C, angl. core) in dveh beljakovin virusne ovojnice (E1, E2, angl. envelope), nahajajo pa se na amino koncu poliproteina (Lin in sod., 1994). Nestrukturnih beljakovin naj bi bilo sedem: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B in p7 (Slika 1). Poliprotein p7 je bil odkrit zadnji, nahaja se na stiku med strukturnimi in nestrukturnimi proteini, deloval naj bi kot ionski kanal in ni znano ali je sploh prisoten v virionu (Dubuisson, 2007).

Posamezni deli genoma HCV se precej razlikujejo v variabilnosti oziroma ohranjenosti. Tako sta oba nekodirajoča konca genoma HCV med najbolj ohranjenimi. 5' nekodirajoči konec je dolg 341 nukleotidov in ima verjetno pomembno vlogo tako pri razmnoževanju virusa kakor tudi pri translaciji virusnih beljakovin (Wang in sod., 1993). 3' nekodirajoči konec je dolg med 40 do 60 nukleotidi in naj bi imel pomembno vlogo pri začetku pomnoževanja virusnega genoma (Yamada in sod., 1996). Poleg teh dveh regij je dobro ohranjena tudi regija, ki kodira beljakovino sredice, katera ima pomembno vlogo tudi pri uravnavanju rasti s HCV okuženih celic in pri razvoju raka (Kato, 2001). Najbolj variabilen del genoma HCV je del regije, ki kodira beljakovino virusne ovojnice E2 in sicer med nukleotidoma 384 in 4141. Ta hipervariabilni predel 1 (HVR1, angl. hypervariable region) je strukturno zelo spremenljiv in vsebuje B-celične epitope, ki so dobro izpostavljeni zunanosti virusa in so tarča imunskega odziva (Weiner in sod., 1992).

2.3 GENETSKA RAZNOLIKOST HCV

Izolate HCV glede na stopnjo genetske variabilnosti razvrščamo v genotipe, podtipe, izolate in kvazi vrste (angl. quasispecies). Ta heterogenost je posledica nenatančne od RNA odvisne RNA polimeraze, ki med replikacijo genoma HCV naredi veliko napak. Na podlagi homologije nukleotidnih sekvenc HCV razvrščamo v šest genotipov in več podtipov (Bourliere in sod., 2002). Pozitivno orientirana molekula RNA HCV je podvržena visoki stopnji mutacij ($1,5-2 \times 10^{-3}$ nukleotidnih substitucij na mesto na leto), zato se lahko določeni genotipi HCV razlikujejo tudi do 30 % glede na cel genom (Katsoulidou in sod., 2006). Različni genotipi imajo lahko od 30-50 % neskladnost nukleotidnega zaporedja, različni podtipi od 15-30 %, variante istega genotipa pa od 1-15 % (Zhou in sod., 2006).

Pri uvrščanju izolatov HCV se upoštevajo primerjave nukleotidnih zaporedij tistih področij genoma, ki imajo zapis za beljakovine virusne ovojnice in za četrto in peto nestrukturno virusno beljakovino (Hoofnagle, 2002). Najbolj variabilna so hipervariabilna področja HVR1 in HVR2 zapisa za beljakovino virusne ovojnice E2. Ti dve področji sta različni med različnimi kvazi vrstami, ki sestavljajo en sam izolat HCV (Weiner in sod., 1992). Zapis v področju HVR1 se hitro spreminja tudi med samo kronično okužbo, kar naj bi imelo pomembno vlogo pri izogibanju imunskemu sistemu gostitelja, saj so zelo verjetno ravno beljakovine virusne ovojnice tarča humoralnega imunskega odziva (Farci in sod., 2000).

2.4 ZEMLJEPISNA RAZPOREDITEV

Nekateri genotipi HCV so precej geografsko omejeni, medtem ko druge najdemo po celem svetu. Podtipa 1a in 1b prevladujeta v Evropi, ZDA in Avstraliji, 1b je prevladujoči podtip na Japonskem, Kitajskem in v Rusiji, medtem ko je v Egiptu najbolj razširjen podtip 4a. Podtip 5a je odgovoren za 50 % okužb v Južni Afriki, v centralni Afriki prevladuje genotip 4, genotipa 3 in 6 pa v jugovzhodni Aziji (Bourliere in sod., 2002). Vendar pa se tudi znotraj teh večjih regij razporeditev genotipov HCV in prekuženost razlikuje od države do države (Sy in sod., 2006). Tako na primer v S Italiji prevladuje podtip 1b z veliko prednostjo, medtem ko je na J Italije genotipa 2 skoraj enak delež, verjetno zaradi priseljevanja (Bellentani in sod., 1999, Guadagnino in sod., 1997).

Začetki epidemije HCV segajo v prejšnje stoletje, ko naj bi uporaba okuženih injekcij, okuženega pribora za operacije in transfuzije okužene krvi in organov precej pripomogli h razširitvi HCV. Kmalu za tem je sledilo širjenje začetnih okužb z i.v. uporabo drog, kar je privedlo do precej večje prevalence. V devetdesetih letih prejšnjega stoletja je sledilo še množično priseljevanje iz endemičnih področij, kar je stanje še bolj zapletlo, saj so s tem v Evropo prišli novi genotipi (Esteban in sod., 2008).

V zadnjih letih prihaja do množičnega priseljevanja ljudi in s tem se vzorec razporeditve genotipov in podtipov iz prejšnjih obdobjev podira. Nekateri podtipi prevladujejo med priseljenci iz določenih področij, kar je opazno tako v Sredozemlju, kot tudi v Severni Evropi, kamor so se priselili iz Azije in tako tam najdemo več genotipa 2. Ker se s priseljevanjem in drugimi aktivnostmi vnašajo novi podtipi v pokrajine, je analiza stanja pomembna za uspešno zdravljenje obolelih (Schröter in sod., 2002). Tudi visoka prevalenca genotipa 4 v Južni Evropi je verjetno posledica priseljevanja ljudi iz Severne Afrike v zadnjem desetletju, kjer je ta genotip prisoten v veliki meri (Ramos in sod., 2006).

Prevalenca okužbe s HCV v Evropi še zdaleč ni homogena, lahko bi rekli da iz severa proti jugu pada, saj ima Skandinavija na primer prevalenco 0,2 %, Francija 1,3 %, Italija pa 3,5 %. Razlogov za to je več, nedvomno pa je k temu pripomoglo priseljevanje predvsem na jug Evrope, večja razširjenost IVUD na jugu in boljši zdravstveni pogoji na severu Evrope. V nekaterih državah južne in centralne Evrope je, na primer, odstotek oseb, ki so se okužili s

transfuzijo 20-30 % vseh okuženih, ki so starejši od 50 let, kar daje slutiti na to, da so bile zdravstvene razmere v preteklosti tam slabše. Injiciranje drog, kot glavni način okužbe, nezadržno večja število novo okuženih in poleg tega tudi širi HCV med IVUD iz različnih evropskih držav, kar so ugotovili s filogenetsko raziskavo izolatov HCV iz različnih evropskih mest. Ta epidemija povezana z injiciranjem drog ima mnoge posledice: večina novih okuženih oseb je mladih IVUD, razporeditev genotipov HCV se iz 1b in 2 premika proti 1a, 3a in 4, vedno pogosteje se pojavljajo rekombinante HCV, na primer 1b/2k, ki otežujejo genotipizacijo in s tem zdravljenje, vedno več obolelih s HIV-om se okuži tudi s HCV (Esteban in sod., 2008).

V zadnjem času je poleg vedno večjega števila IVUD v Evropi pomemben dejavnik tudi množično priseljevanje imigrantov, kar sicer ni nov pojav na tem področju, je pa sedaj toliko bolj problematičen, saj je delež s HCV okuženih imigrantov vedno večji. Ti so večinoma iz nižjih družbenih slojev in iz endemičnih področij, kot so Azija, podsaharska Afrika, Latinska Amerika in vzhodna Evropa, tako da zaskrbljenost ni odveč. Po ocenah naj bi v Španijo imigriralo do 90.000 okuženih imigrantov v zadnjih 15 letih, na Nizozemskem naj bi 56 % vseh okuženih s HCV predstavljali imigranti, v Nemčiji 37 %, v Italiji pa je bilo od vseh na novo okuženih v letu 2002 41 % imigrantov. V zadnjih 15-ih letih naj bi v Evropo imigriralo okoli 20 milijonov ljudi, večinoma revnejših in če to povežemo z vedno večjim številom IVUD, je slika prevalence HCV in epidemiologije v Evropi precej dramatična (Esteban in sod., 2008).

Vzorec epidemije HCV se v zadnjih 15-ih letih mnogo hitreje spreminja kot prej, saj se glavni epidemiološki parametri (prevalenca, razširjenost, načini prenosa in razporeditev genotipov) spreminjajo iz leta v leto. Predvsem v Evropi so opazne izrazite spremembe, ki so posledica bolj varnega postopka transfuzije krvi, boljših bolnišničnih pogojev, razširjanja IVUD in imigracije v Evropo iz endemičnih področij (Esteban in sod., 2008).

2.5 NAČINI PRENOSA HCV

2.5.1 Prenos okužbe s HCV pri intravenskem uživanju drog

Danes je prenos okužbe s HCV z intravensko uporabo drog najpogostejši in najnevarnejši dejavnik tveganja, pri katerem pride zaradi uporabe in izmenjave rabljenih igel med uživalci do prenosa okužbe. Predvsem pa se večja delež tega dejavnika tveganja v razvitem zahodnem svetu. V Franciji je bilo na primer leta 2002 med 1183 okuženimi kar 45,4 % IVUD in ta številka se še večja (Bourliere in sod., 2002).

Tudi v Avstriji so leta 2001 med 250 okuženimi iz okolice Dunaja odkrili, da je bilo 30 % vseh okužb povzročenih z intravensko uporabo drog (Haushofer in sod., 2001). Še bolj presenetljiv je podatek, da so v ZDA med leti 1988 in 1994 v zelo obsežni raziskavi ugotovili, da je kar 48 % vseh okuženih IVUD (Armstrong in sod., 2006), kar pa še vedno ni veliko v primerjavi z avstralsko raziskavo, ki so jo izvedli med letoma 1997 in 2000 in odkrili, da je bilo med 912 novo odkritimi okuženimi kar 93 % IVUD (Robotin in sod., 2004).

Nekateri znanstveniki so se lotili raziskovanja povezave med HCV in i.v. uporabo drog iz druge smeri, kar pomeni, da so pod drobnogled vzeli celotno populacijo IVUD na določenem področju in raziskali delež okuženih. Tako so na primer med leti 1988 in 1996 v ZDA ugotovili 30 % prevalenco HCV (Villano in sod., 1997), v Belgiji med 310 IVUD v različnih mestih med 46 % in 71 % prevalenco (Mathei in sod., 2005), v Avstraliji med 36,6 % in 74 % prevalenco (Bradshaw in sod., 2005). V Londonu pa je bilo med 428 IVUD mlajšimi od 30 let okuženih s HCV 44 % in samo 4 % s HIV (Judd in sod., 2005).

2.5.2 Prenos okužbe s HCV pri transfuziji krvi in krvnih pripravkov

Do leta 1991 je bil v razvitih državah glaven način prenosa HCV transfuzija krvi in krvnih pripravkov, kar je predstavljalo približno tretjino okužb. Ko so okoli leta 1991 začeli kri za transfuzijo testirati, je prvo mesto kot najpogostejši način prenosa HCV prevzela intravenska uporaba drog (Gérard in sod., 2005). Tako so na primer v Franciji odkrili, da je pogostost

okužbe s transfuzijo padla iz 48,7 % pred letom 1978 na 5,2 % po letu 1990 in da je pogostost okužbe z injiciranjem drog narasla iz 35,1 % na 54,8 % (Bourliere in sod., 2002).

Pri prenosu okužbe s HCV s transfuzijo so največji problem predstavljali pripravki dejavnikov strjevanja krvi, ki so bili pripravljene iz večjega števila različnih krvodajalcev (do 2500), saj je bil tako dovolj le en okužen, da se je okužba prenesla (Van der Poel in sod., 1998). Sodobni encimsko imunski testi odkrijejo že skoraj 100 % anti-HCV pozitivne krvi, tako da resno grožnjo predstavljajo samo še krvodajalci, ki so v obdobju t. i. diagnostičnega okna, torej v obdobju viremije pred serokonverzijo (Alter, 1997). V večini razvitih držav (EU, ZDA, Japonska...) so bile v zadnjih petih letih za testiranje krvi krvodajalcev v transfuzijski medicini uvedene t. i. tehnike NAT (angl. nucleic acid techniques), s katerimi se odkriva HCV RNA. Transfuzijski centri uporabljajo dve vrsti metod NAT, verižno reakcijo s polimerazo (angl. PCR, polimerase chain reaction) in pomnoževanje s pomočjo transkripcije (angl. TMA, transcription mediated amplification). S temi tehnikami se diagnostično okno v povprečju skrajša za dva meseca iz 82 na 23 dni (Coste, 2005).

2.5.3 Prenos okužbe s HCV pri presaditvi organov

Če je darovalec organa RNA HCV pozitiven, je tveganje za prenos okužbe precej visoko, ocenjujejo da je tveganje za prenos okužbe z viremičnega darovalca približno 78 % pri tem pa okužba vedno poteka kronično. Pri teh bolnikih zaradi imunosupresije ne nastajajo protitelesa, zato je potrebno iskati RNA HCV (Pereira in sod., 1995)

2.5.4 Prenos okužbe s HCV pri hemodializi

Do prenosa okužbe s HCV pri hemodializi pride večinoma zaradi slabe kontrole hemodializnih membran in opreme, ki se uporablja na hemodializnih oddelkih. Tako se je, še preden se je vedelo za HCV in njegov način prenašanja, okužilo veliko ljudi. Ocenjuje se, da je približno 10-40 % bolnikov na hemodializi okuženih s HCV (Pujol, 1996). V Slovenski raziskavi iz leta 1995 so ugotovili, da je v Sloveniji s HCV okuženih približno 55,5 % bolnikov na hemodializi (Seme, 1995). V raziskavi o pogostosti okužbe v slovenskih

hemodializnih enotah so ugotovili, da se ta giblje med 0 % v celjski bolnišnici in 34 % v izolski (Seme, 1996).

2.5.5 Ostali načini prenosa okužbe s HCV

Ostali možni načini prenosa okužbe s HCV so sledeči: spolni, vertikalni, prenos pri zdravstvenih delavcih, tetoviranje, britje z istim priborom, prebadanje, njuhanje, akupunktura, zobozdravniški posegi.

Možnost prenosa okužbe s HCV pri spolnem stiku je precej nizka, predvsem zaradi nizke koncentracije HCV v krvi in spermi. To dokazujejo raziskave, ki so odkrile bistveno nižjo prevalenco HCV pri partnerjih okuženih oseb, kot pa na primer za HIV ali HBV v podobno zasnovanih raziskavah. Učinkovitost prenosa za HCV je bila ocenjena na 5 %, medtem ko je bila za HIV 15 %, za HBV pa celo 30 % (Utsumi in sod., 1995).

Vertikalni prenos okužbe s HCV iz mame na novorojenčka je zelo redek. Prenos je mnogo bolj verjeten pri RNA HCV pozitivnih materah, tveganje pa še dodatno poveča sočasna okužba matere s HIV ali visoka raven serumske alanin-aminotransferaze (ALT) (Linn in sod., 1994).

Verjetnost okužbe med zdravstvenimi delavci v Sloveniji, kjer so v sedemletnem obdobju zajeli 373 perkutanih poškodb, je največja pri medicinskih sestrah in zdravstvenih tehnikih (48,5%) z vbodom z votlo iglo (68,4 %). Pri perkutani izpostavitvi krvi bolnika s hepatitisom C je možnost okužbe pri poškodovancu 3-10 % (Lešničar, 2005).

2.6 POTEK OKUŽBE

Življenjski krog HCV je slabo poznan, saj virusa do nedavnega niso mogli uspešno gojiti *in vitro* na celičnih kulturah, prav tako pa so poskuse *in vivo* lahko do nedavnega delali le na šimpanzih. Po vstopu v gostitelja se virus pritrdi na specifični receptor na površini gostiteljske celice, pri čemer se virusna sredica sprosti v citoplazmo iz nje pa virusna RNA, ki sodeluje tako pri prevajanju nukleotidnega zaporedja v aminokislino kot pri pomnoževanju

genoma HCV v citoplazmi. Vgrajevanje genoma v virusno sredico poteka v endoplazmatskem retikulumu, ovijanje viriona z lipidno membrano pa v Golgijevem aparatu. Novo nastali virusi se sprostijo iz celic z eksocitozo (Penin in sod., 2004).

Po mnogih poskusih je znanstvenikom leta 2005 končno uspelo vzpostaviti sistem gojenja virusa HCV na celični kulturi s transfekcijo celične linije človeških celic hepatoma Huh-7 s klonirano genomsko RNA podtipa HCV 2a, vendar so intenzivne raziskave še v teku, saj ima ta sistem še vedno nekaj omejitev (Močilnik, 2008).

Prisotnost virusne RNA v serumu se zazna že v enem do dveh tednih po okužbi. Virusno breme hitro naraste na 10^6 kopij/mL, vendar kljub temu ne pride do imunskega odziva še 2 do 3 mesece, kar virusu omogoča prevlado nad imunskim sistemom gostitelja (Bertoletti in Ferrari, 2003). Hitremu porastu virusne RNA v serumu sledi obdobje 4-6 tednov, ko se kljub odsotnosti specifičnih limfocitov B in T in vnetnega odziva v jetrih virusno breme umiri. Količina ALT v serumu doseže vrh v 8.-12. tednu, takrat začne virusno breme v serumu upadati in pride tudi do pojava specifičnih protiteles proti HCV. Zaradi 2 do 3 mesečne zamude imunskega odziva, se za dokazovanje HCV v začetnem obdobju uporabljajo molekularne metode (Rehermann in Nascimbeni, 2005).

Inkubacijska doba okužbe s HCV traja od 6 do 8 tednov. Skoraj pri vseh okuženih pride do poškodbe hepatocitov, kar se kaže le kot zmerno zvišanje vrednosti serumskih aminotransferaz, predvsem ALT. Po tem obdobju se pri 20 do 30 % bolnikom pojavijo znaki akutnega hepatitisa, ki so precej blažji kot pri akutnem virusnem hepatitisu B. Če pride pri bolniku do simptomov, se ti kažejo kot prehlad, slabost in bolečine v mišicah, nekoliko kasneje se pojavi še zlatenica, vendar pri večini do simptomov ne pride in bolezen poteka povsem subklinično, kar je velik problem HCV (Hoofnagle, 1997). Vendar pa lahko po drugi strani pri od 15 do 50 % nezdravljenih pacientov okužba spontano izzveni (Lehman in sod., 2004).

Približno 75 % okužb s HCV sčasoma preide v kronični hepatitis. Kronična oblika hepatitisa C ni posledica direktnega uničenja jetrnih celic s strani virusa, ampak je bolj posledica imunskega odziva. Ta je dovolj intenziven, da pospešuje uničenje jetrnih celic in fibrozo, ne pa dovolj da bi odstranil virus iz telesa (Heydtmann in sod., 2001). Po desetih letih okužbe s

HCV se le ta 10-20 % pacientom razvije v cirozo jeter (Haushofer in sod., 2001). Po več kot 20-ih letih prikrite kronične okužbe privede hepatitis C do nastanka jetrne ciroze. Njeni klinični znaki in simptomi so pri mnogih prvi in edini znaki okužbe s HCV (Esteban in sod., 1998). Po multivariantni analizi so ugotovili, da razvoj ciroze ni povezan z genotipom ampak bolj s časom izpostavljenosti bolnika virusu, imunsko oslabeledostjo (bolniki s HIV) in ostalimi kofaktorji hepatitisisa (alkohol ali hepatitis B) (Payan in sod., 2005).

Potek same bolezni je odvisen tako od lastnosti virusa kot od lastnosti bolnika. Poleg količine vneselega virusa ob okužbi, lahko na potek okužbe vpliva tudi genotip HCV in število kvazi vrst (Seeff, 1997). Med lastnosti bolnika, ki vplivajo na potek okužbe pa bi lahko šteli starost, spol, uživanje alkohola, istočasna okužba s HIV in nizko število CD4, poleg tega pa še trajanje okužbe (Poynard in sod., 2001). Ugotovili so, da ima imunski odgovor bolnika pglavitno vlogo pri patogenosti virusnega hepatitisisa, saj učinkovito sodeluje tako pri nadzorovanju virusne okužbe in okrevanju kot pri razvoju kroničnega hepatitisisa C in ciroze jeter (Caruntu in Benea, 2006). Bolniki s slabšim imunskim odzivom v akutni fazi bolezni so pogosto brez simptomov in je večja verjetnost da bodo postali kronični nosilci, kot tisti bolniki ki so imeli močan imunski odziv (Poynard in sod., 2003).

2.7 DIAGNOSTIKA HEPATITISA C

Diagnostika okužbe s HCV temelji na posrednih diagnostičnih metodah, s katerimi določamo protitelesa proti HCV v serumskih vzorcih bolnikov in na neposrednih metodah, s katerimi določamo virusno nukleinsko kislino. Virusno nukleinsko kislino dokazujemo s kvalitativnimi in kvantitativnimi testi za dokazovanje nukleinskih kislin, t. i. tehnike NAT. Encimsko imunski presejalni testi (EIA, angl. enzyme immunoassay) se uporabljajo za dokazovanje protiteles (Zein, 2000). Prvim testom, ki so uporabljali le en antigen, so postopoma dodajali nove in tako se z dodajanjem antigenov v specifični del reakcije večja občutljivost anti-HCV testov (Kao in sod, 1996). Tretja generacija EIA testov je že tako občutljiva in specifična, da se danes ne izvaja več potrditvenih imunoblot testov, ki so jih včasih zaradi nezanesljivosti presejalnih testov izvajali (Pawlotsky, 2002). Potrditveni testi so temeljili na uporabi rekombinantnih virusnih beljakovin, predhodno ločenih z gelsko elektroforezo in nato prenesenih na nitocelulozno membrano po klasičnem Western blot

postopku. Mnogo bolj uporabna različica Western blot testov so imunoblot testi, kjer so rekombinantne ali sintetične virusne beljakovine nanese na nitrocelulozno membrano s posebnim postopkom v obliki jasno omejenih trakov (Seme in Poljak, 1995; Seme in Poljak, 1996).

V prvi generaciji encimsko imunskih testov so kot antigen uporabljali beljakovini 5-1-1 in c-100-3, ki so ju pridobili iz nestrukturiranih beljakovin NS3 in NS4. Testom prve generacije so dodali še beljakovini sredice c22, ki so jo pridobili iz zelo ohranjene virusne sredice in c33c, katero pa so pridobili iz predela NS3, ki je slabše ohranjen. Testi tretje generacije imajo poleg naštetih antigenov dodan še del NS5, imenovan BHC7 (Zein, 2000).

Za diagnozo okužbe s HCV se danes uporabljajo večinoma encimsko imunski testi tretje in četrte generacije s katerimi se dokazuje anti-HCV protitelesa IgG v serumu okužene osebe. Pozitivnega rezultata zaradi zanesljivosti teh testov ni več potrebno potrjevati. Za ločevanje aktivnega hepatitisa C od prebolelega je potrebno serumski vzorec anti-HCV pozitivne osebe preiskati za virusno RNA z molekularnimi metodami, kot sta PCR in TMA. Pozitiven rezultat pomeni aktivno okužbo s HCV. Pri akutnem hepatitisu C RNA HCV po enem letu po okužbi v serumu ni več prisotna, zato se za potrditev kroničnega hepatitisa C izvajata dva testa v razmaku 6 do 9 mesecev. Pozitivna rezultata pomenita, da gre za kronični hepatitis C. Za potrditev prebolelega hepatitisa C je potrebno serum bolnika testirati za HCV RNA dvakrat v enem letu. Oba negativna rezultata pomenita preboleli hepatitis C (Seme in sod., 2009).

Če serološke teste izvedemo v obdobju serokonverzije, ki traja od 8 do 12 tednov ali pa na začetku okužbe, ko je v serumu prisotnih le malo protiteles, dobimo negativen anti-HCV rezultat. Do negativnih anti-HCV rezultatov lahko pride tudi zaradi slabega imunskega odziva na HCV (Pawlotsky, 2002). Danes se uporablja kvalitativno različico PCR za določevanje, ali prisotnost protiteles proti HCV v serumu bolnika pomeni že v preteklosti prebolelo ali še aktivno okužbo s HCV ter za odkrivanje okužbe s HCV pred serokonverzijo ali na njenem začetku (Seme in Poljak, 1995; Seme in Poljak, 1996).

Z molekularnimi metodami je mogoče odkriti okužbo s HCV 40 do 100 dni prej kot s serološkimi metodami. Ob sumu na akutni hepatitis c je potrebno skupaj s serološkimi testi opraviti tudi preiskave z molekularnimi metodami, saj v t. i. diagnostičnem oknu anti-HCV

protitelesa še niso zaznavna. Molekularne metode se uporabljajo tudi za testiranje krvi krvodajalcev, za dokazovanje okužbe pri osebah z oslabljenim imunskim sistemom (HIV) in hemodializnih osebah ter za razlikovanje paranteralno prenesenega hepatitisa C od pasivnega prenosa pri dojenčkih anti-HCV pozitivnih mater. Občutljivost kvalitativnih molekularnih metod je 5-15 IU HCV RNA/ml seruma (Seme in sod., 2009)..

Neposredne metode molekularne virologije, s katerimi določamo virusno nukleinsko kislino, so nepogrešljive pri odkrivanju kroničnih nosilcev HCV, zgodnje okužbe s HCV pred serokonverzijo, pri odkrivanju in kvantifikaciji viremije, spremljanju protivirusnega zdravljenja, odločanju o shemi protivirusnega zdravljenja in pri razlikovanju prave okužbe od pasivnega prenosa protiteles (Seme in sod., 1994).

Genotipizacija in kvantitativne molekularne metode se uporabljajo izključno pri bolnikih, ki so določeni za protivirusno zdravljenje hepatitisa C, za določitev načina in trajanja zdravljenja ter za spremljanje učinkovitosti zdravljenja. Za določevanje genotipa HCV se najpogosteje uporablja metoda reverzne hibridizacije, za kvantitativno določevanje količine virusne RNA pa se danes najpogosteje uporablja PCR v realnem času, s katero se lahko natančno določi koncentracijo RNA od 5-15 IU/ml do več kot 100.000.000 IU HCV RNA/ml seruma (Seme in sod., 2009).

2.8 RAZPOREDITEV HCV V SLOVENIJI DO LETA 2003

V Sloveniji sta bili do leta 2003 izvedeni dve raziskavi, ki sta podrobno preučili podatke o osebah okuženih s HCV. V prvi so bili zajeti vsi pacienti od leta 1993, ko se je pri nas začelo testiranje za HCV, do leta 1997, v drugi pa so bili zajeti vsi pacienti od leta 1993 do vključno 2002.

V Sloveniji je tako kot drugje po svetu že nekaj let najpogostejši dejavnik tveganja okužbe s HCV intravensko uživanje drog. Ta dejavnik je vedno pogostejši in je leta 1997 predstavljal 36,4 % vseh okuženih, medtem ko je leta 2002 predstavljal že 54,1 %. Prav tako je narasel tudi delež okuženih hemofilikov iz 3,0 % na 9,1 %. Po drugi strani pa so se deleži vseh ostalih dejavnikov tveganja zato znižali, predvsem logično je, da se je zmanjšal delež

neznanega dejavnika tveganja iz 28,2 % na 16,6 %, saj je bilo pri nas uvedeno testiranje leta 1993. Največji upad deleža je bil zabeležen pri hemodializnih bolnikih, saj je iz 18,2 % padel na samo 5,8 %, malo manjši upad je bil odkrit pri zdravstvenih delavcih, iz 3,9 % na 1,7 %, še najmanjši pa pri transfuziji, iz 10,3 % je padel na 8,2 %.

Spremembe so se seveda v tem obdobju zgodile tudi pri razporeditvah genotipov, saj so ti tesno povezani z dejavniki tveganja. Tako je precej logično, da se je delež genotipa 3 dvignil iz 25,6 % na 31,8 %, saj se je istočasno povečal tudi delež IVUD okuženih s HCV, kjer je ta genotip leta 2002 povprečno predstavljal 53,9 %. Delež podtipa 2b je v tem obdobju padel z 7,4 % na 2,4 %, verjetno zaradi upada deleža hemodializnih bolnikov, kjer je ta podtip predstavljal največji delež (leta 1997 24,3 %, leta 2002 16,2%). Delež podtipa 1b je, zanimivo, ostal na skoraj istem odstotku, iz 34,0% se je povzpela na 34,2 %. Dejavniki tveganja okužbe, kjer je ta podtip najbolj prisoten so hemodializni bolniki (40,6 %), hemofiliki (42,4 %) in prejemniki krvi, tkiv in organov (69,9 %), vendar je skupno število teh močno upadlo v tem obdobju, medtem ko se je število IVUD precej povečalo, kjer pa je povprečen delež podtipa 1b v tem obdobju 6,7 %. Upad deleža podtipa 1a z 28,1 % na 23,1 % je morda še najtežje razložiti, saj je ta podtip najbolj zastopan ravno med IVUD (31,7 %). Je pa res, da ima nezanemarljive deleže tudi med drugimi dejavniki tveganja, kot so prejemniki krvi, tkiv in organov (10,9 %), hemofiliki (23,7 %), osebe s tveganimi spolnimi stiki (41,2 %) in pri zdravstvenih delavcih (35,7 %), katerih deleži so se močno zmanjšali. Tudi med IVUD je delež podtipa 1a padel iz 43,2 % leta 1997 na 31,7 % leta 2002, tako da je verjetno več razlogov privedlo do splošnega upada deleža.

Kot je iz rezultatov predhodnih raziskav razvidno je delež genotipa 3 do leta 2002 strmo naraščal, delež podtipa 1b strmo padal, delež podtipa 1a pa ostal na približno istem deležu. To vse močno sovпада z deleži dejavnikov tveganja okužbe in podoben trend lahko pričakujemo tudi v prihodnje.

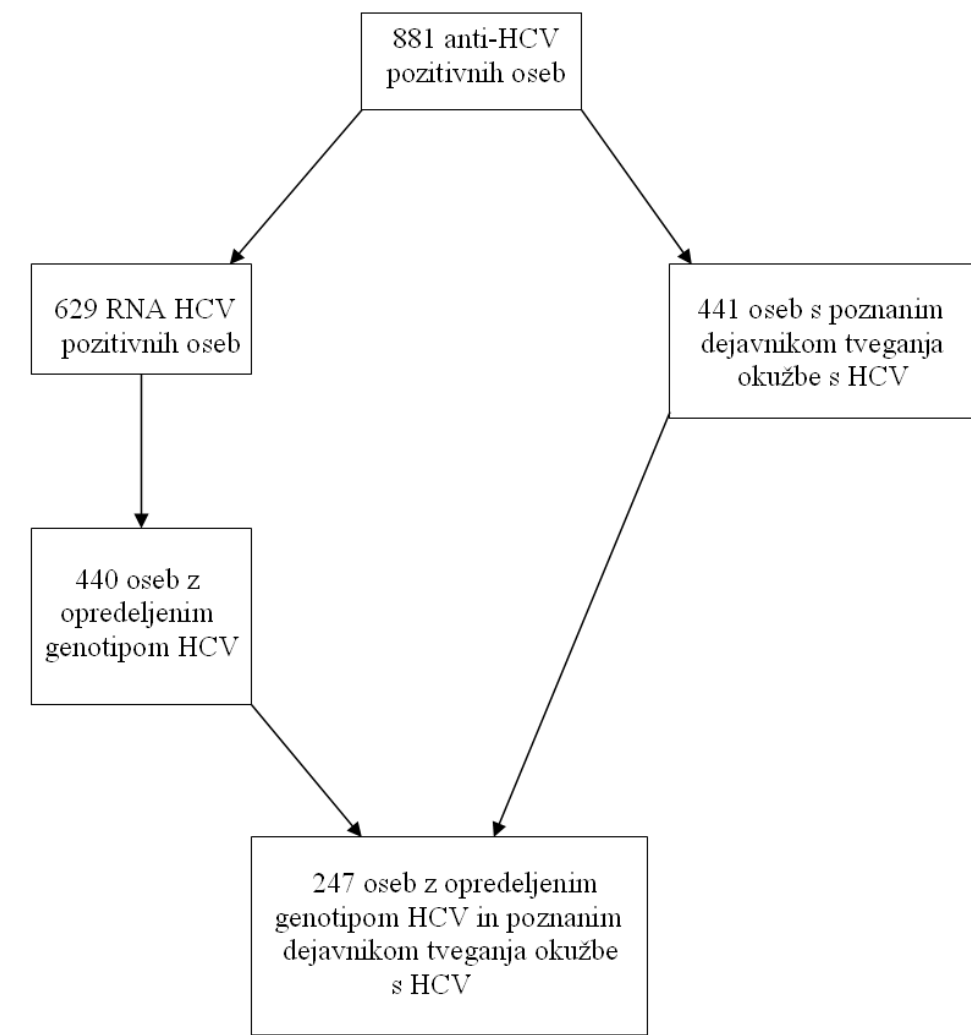
3 MATERIAL IN METODE

3.1 BOLNIKI

V raziskavo smo vključili vse bolnike iz arhiva Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete v Ljubljani, pri katerih so bila v obdobju med leti 2003 in 2006 z encimsko imunskimi testi dokazana protitelesa proti HCV. V vseh izbranih anti-HCV pozitivnih serumskih vzorcih smo določili prisotnost virusne RNA s testom reverznega prepisovanja tarčne RNA do komplementarne DNA (cDNA), pomnoževanjem tarčnega pridelka s PCR in s hibridizacijo nukleinskih kislin za odkrivanje RNA HCV v serumu. Spodnja meja občutljivosti uporabljenega testa COBAS AMPLIPREP/COBAS AMPLICOR HCV Test, v. 2.0 (Roche Diagnostic System, Branchburg, ZDA) je 50 IU/ml. S testom smo pomnožili 244 bp velik odsek, ki smo ga uporabili za genotipizacijo.

V raziskavo je bilo vključenih 891 oseb z dokazano okužbo s HCV. Iz arhiva smo zbrali splošne podatke o bolnikih in rezultate preiskav na okužbo s HCV ter za vsakega bolnika poslali vprašalnik zadnjemu odgovornemu zdravniku o verjetnem dejavniku tveganja okužbe s HCV. Podatki pridobljeni iz arhiva in vprašalnikov so obsegali starost, spol, dejavnik tveganja, genotip HCV, prisotnost virusne RNA v vzorcu in leto postavitve diagnoze. Med dejavniki tveganja so bili na izbiro transfuzija krvi in krvnih pripravkov, hemodializa, intravensko uživanje drog, tvegano spolno obnašanje, družinski stik, zdravstveni delavci, tetoviranje in ostali dejavniki.

Na sliki 2 so prikazani pridobljeni podatki za 891 oseb okuženih s HCV. Od 891 anti-HCV pozitivnih oseb smo dobili od odgovornih zdravnikov odgovore o dejavniki tveganja za 441 oseb. Med 891 anti-HCV pozitivnimi osebami, jih je bilo 629 tudi RNA HCV pozitivnih. Genotip je bilo mogoče opredeliti pri 443 osebah. Med 891 anti-HCV pozitivnimi osebami je bilo 247 oseb, ki so imele opredeljen genotip HCV in prav tako poznan dejavnik tveganja okužbe.



Slika 2: Prikaz pridobljenih podatkov pri osebah okuženih s HCV obravnavanih v naši raziskavi v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=891).

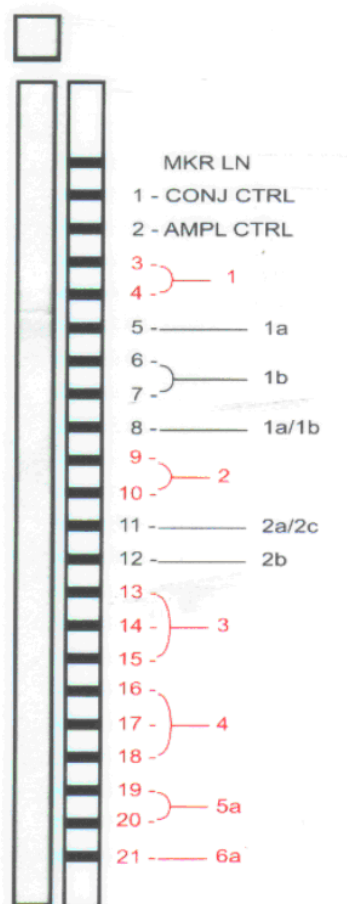
3.2 GENOTIPIZACIJA

Genotipizacijo izolatov HCV smo izvedli z metodo reverznega dot-blota, ki temelji na hibridizaciji odseka 5' nekodirajočega dela genoma HCV, pomnoženega s PCR, z 19 tipsko-specifičnimi sondami, vezanimi na nitrocelulozno membrano. Pri tem je bil uporabljen standardni test za genotipizacijo HCV INNO-LIPA HCV II (Innogenetics, Ghent, Belgija), ki je imel na nitrocelulozni membrani v obliki omejenih trakov vezane sledeče sonde:

- 2 specifični za genotip 1
- 1 specifično za podtip 1a
- 2 specifični za podtip 1b

- 1 specifično za kombinacijo podtipov 1a/1b
- 2 specifični za genotip 2
- 1 specifično za kombinacijo podtipov 2a/2c
- 1 specifično za podtip 2b
- 3 specifične za genotip 3
- 3 specifične za genotip 4
- 2 specifični za podtip 5a
- 1 specifično za podtip 6a

Poleg vseh teh sond je na vsako membrano vezana tudi DNA lovka značilna za 5' nekodirajoča področja vseh genotipov HCV in trak za nadzor pravilnosti postopka detekcije nastalih hibridizacijskih kompleksov (Slika 3).



Slika 3: Nitrocelulozna membrana v obliki traku z vezanimi DNA lovkami, specifičnimi za posamezne genotipe HCV.

Pred tipizacijo je bilo potrebno virusno RNA osamiti in prepisati v cDNA ter pomnožiti 244 bp velik odsek najbolj ohranjenega dela genoma HCV. 50 μ l z biotinom označenega pomnoženega odseka smo nato skupaj z 2 ml hibridizacijske tekočine, ogrete na 50°C dodali v posebno posodico, v kateri je bila tudi nitrocelulozna membrana z 19 specifičnimi DNA sondami. Hibridizacija je trajala 1 uro v hibridizacijski tekočini pri 50°C. Po končani hibridizaciji smo z vakumskim aspiratorjem odstranili vso tekočino in na membrano dodali 2 ml razopine za spiranje, ogrete na 50°C. S stresanjem 60 s na stresalniku smo odstranili vso tekočino in postopek ponovili še enkrat. Sledila je inkubacija membrane 30 minut pri 50°C z 2 ml ogrete raztopine za spiranje. Po končani inkubaciji smo membrano dvakrat spirali po eno minuto z raztopino za spiranje. Prisotnost hibridiziranih kompleksov smo dokazali s streptavidinom, ki je bil označen z alkalno fosfatazo. Nevezani kompleks smo po 30 minutni inkubaciji na stresalniku pri sobni temperaturi odstranili z dvakratnim spiranjem z raztopino za spiranje in enkratnim spiranjem s substranim pufrom. Na membrano smo nato dodali 2 ml encimskega substrata, ki je vseboval 5-bromo-kloro-indolilfosfat in nitratno modro tetrazolij v dimetil-formamidu. Sledila je 30 minutna inkubacija na stresalniku pri sobni temperaturi in dvakratno spiranje z destilirano vodo. Membrano smo pustili, da se posuši na zraku. Na mestih nitrocelulozne membrane, kjer je prišlo do popolne komplementarnosti nukleotidnih zaporedij, so se pojavili rjavo obarvani traki. Glede na pozicijo obarvanih trakov smo s primerjanjem položajev obarvanih trakov na membrani s položaji vezanih specifičnih sond odčitali genotip oziroma podtip. Uspešnost in pravilnost postopka smo preverili z obarvanostjo trakov za kontrolo pomnoževanja in kontrolo konjugata.

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično primerjavo kvantitativnih podatkov smo uporabili Studentov t test, za primerjavo atributivnih spremenljivk pa χ^2 test (z Yatesovo korekcijo za frekvence manjše od 5). Kot statistično značilne smo upoštevali razlike pri vrednosti $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 EPIDEMIOLOŠKE ZNAČILNOSTI OKUŽBE S HCV V SLOVENIJI

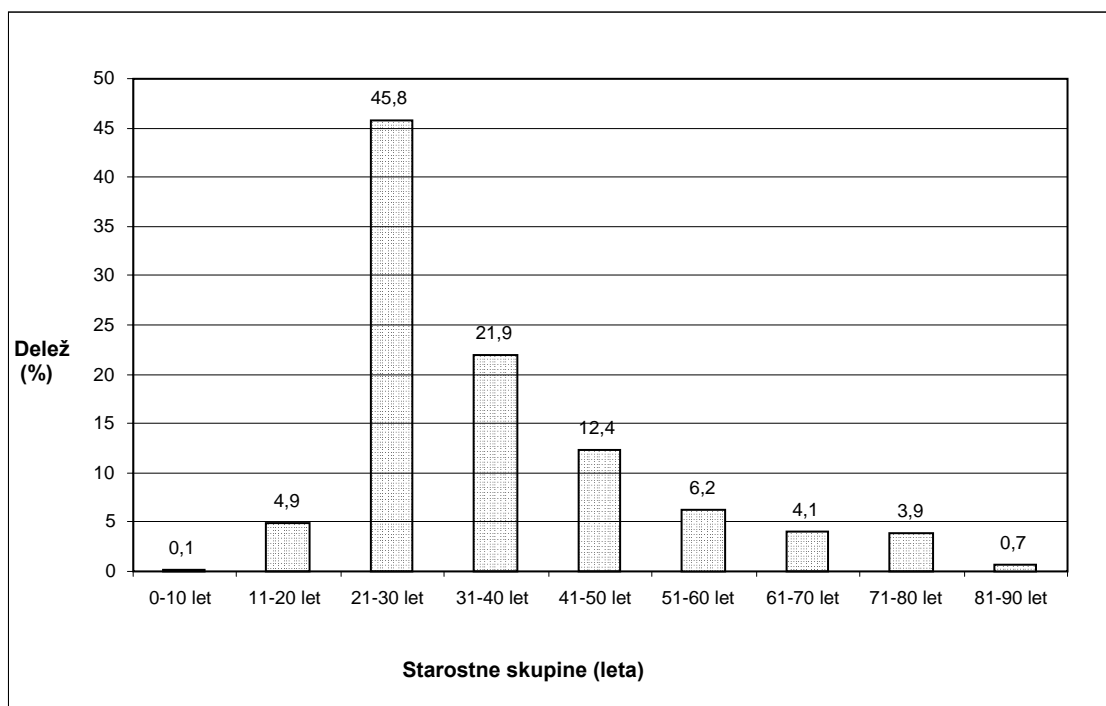
V obdobju od 01.01.2003 do 31.12.2006 so bila protitelesa anti-HCV dokazana pri 891 osebah. Prisotnost protiteles je bila določena z encimsko imunskim testom tretje generacije različnih proizvajalcev. Specifičnost dokazanih protiteles smo potrdili s potrditvenim testom INNO-LIA™ HCV Ab III update (Inogenetics, Ghent, Belgija).

Ugotovljena povprečna starost vseh okuženih s HCV v navedenem obdobju v Sloveniji je 35,6 let. 576 (65,4 %) vseh okuženih oseb je bilo moških s povprečno starostjo $34,7 \pm 13,2$ let, 294 (33,4 %) oseb je bilo žensk s povprečno starostjo $37,4 \pm 17,1$ let, za 11 (1,2 %) oseb od vseh okuženih pa tega podatka ni. Ženske so bile statistično pomembno starejše v primerjavi z moškimi ($p < 0,05$). V Preglednici 1 je prikazano število novo odkritih okužb s HCV po letih.

Preglednica 1: Število novo odkritih anti-HCV pozitivnih oseb v Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete v Ljubljani v obdobju od 01.01.2003 do 31.12.2006.

LETO	Število novo odkritih anti-HCV pozitivnih oseb
2003	218
2004	235
2005	225
2006	213
skupaj	891

Vse anti-HCV pozitivne osebe smo razdelili v starostne skupine 0-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 let glede na starost ob postavitvi diagnoze. Rezultati so prikazani na sliki 4, kjer se jasno vidi, da je bilo daleč največ okuženih s HCV v Sloveniji odkritih v starostni skupini 21-30 let (45,8 %), veliko jih je bilo odkritih tudi v starostni skupini 31-40 let (21,9 %), tako da ti dve starostni skupini zajameta kar dobri dve tretjini vseh okuženih.



Slika 4: Starostne skupine oseb okuženih s HCV v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=891).

Podatke o dejavniki tveganja vseh oseb okuženih s HCV v danem obdobju smo pridobili od njihovih lečečih zdravnikov, ki so nam jih poslali v obliki izpolnjenih obrazcev, katere smo jim predhodno poslali. Podatki o dejavniki tveganja za 891 anti-HCV pozitivnih oseb so prikazani v Preglednici 2.

Preglednica 2: Dejavniki tveganja okužbe s HCV v Sloveniji v letih 2003 - 2006.

Dejavniki tveganja okužbe	Število oseb	Odstotek
Intravenska uporaba drog	344	38,6
Prejemnik krvi in krvnih pripravkov	28	3,1
Osebe, ki so se okužile s spolnimi stiki	9	1,0
Zdravstveni delavec	4	0,4
Tetoviranje	3	0,3
Neznano	503	56,8
Skupaj	891	100

Za 503 osebe (56,8 %) okužene s HCV dejavnik tveganja ni bil poznan. Za 450 od teh 503 oseb lečeči zdravnik ni vrnil vprašalnika, ostalih 53 oseb pa lečeči zdravnik ni mogel uvrstiti

v nobeno od skupin z dejavnikom tveganja za okužbo s HCV. Kot je iz Preglednice 2 razvidno je bila intravenska uporaba drog daleč najbolj pogost dejavnik tveganja v Sloveniji s 344 osebami (38,6 %), med katere smo uvrstili tudi 5 oseb z več dejavniki tveganja okužbe, vendar pa je zelo verjetno intravenska uporaba drog primarni vzrok za okužbo. Drugi najpogostejši dejavnik tveganja so bili prejemniki krvi in krvnih pripravkov s 28 osebami (3,1 %), med katerimi je bilo 5 hemofilikov. Odkritih je bilo tudi 9 oseb (1 %), ki so se okužile s spolnimi stiki. Od tega sta bila 2 homo oz. biseksualna moška, 1 heteroseksualna ženska in 6 oseb, ki so imele heteroseksualni stik z IVUD. V tem obdobju so se s HCV okužili tudi 4 zdravstveni delavci (0,4 %), 3 osebe pa so se okužile s tetoviranjem (0,3 %).

4.2 RAZPOREDITEV GENOTIPOV HCV V SLOVENIJI

Med 891 anti-HCV pozitivnimi osebami je bilo 629 tudi RNA HCV pozitivnih, kar pomeni, da so imeli v serumu prisotno virusno RNA. Med vsemi okuženimi je bil genotip HCV določen pri 443 osebah, kot je prikazano v Preglednici 3. Pri 232 osebah (52,4 %) je bil ugotovljen genotip 1, z genotipom 2 je bilo okuženih 15 oseb (3,4 %), z genotipom 3 je bilo okuženih 194 oseb (43,8 %), z genotipom 4 pa 2 osebi (0,5 %).

Preglednica 3: Razporeditev genotipov HCV v Sloveniji v letih 2003 - 2006.

Genotip HCV	št. oseb	delež
1	232	52,4 %
2	15	3,4 %
3	194	43,8 %
4	2	0,4 %
Skupaj	443	100,0 %

4.3 RAZPOREDITEV GENOTIPOV HCV GLEDE NA STAROST BOLNIKOV

Preglednica 4 prikazuje različne deleže genotipov v starostnih skupinah oseb okuženih s HCV. Genotip 1 je imel največji delež v starostni skupini 21-30 let (32,8 %), nato v starostni skupini 31-40 let (24,1 %), pomemben delež je imel tudi v skupinah 41-50 let (18,5 %) in 51-

60 let (11,6 %). V ostalih starostnih skupinah je imel manjše deleže, v skupini 61-70 let 5,6 %, v skupini 71-80 let 3,4 %, v skupini 81-90 let 0,4 %, v skupini 0-11 let 0,4 % in v skupini 11-20 let 3 %.

Genotip 2 je bil precej enakomerno porazdeljen po vseh skupinah. Največji delež je imel v skupini 31-40 let 20 %, skupinah, najmanjši delež v skupini 11-20 let in 51-60 let 6,7 %, v ostalih skupinah pa je imel deleže 13,3 %.

Genotip 3 je bil najbolj pogost v starostni skupini 21-30 let z 59,3 %, nato v skupini 31-40 let 24,2 %, v ostalih skupinah pa so bili deleži precej nižji.

Genotip 4 je imel samo dva predstavnika, enega v starostni skupini 11-20 let in drugega v skupini 21-30 let.

Preglednica 4: Število in deleži genotipov 1, 2, 3 in 4 po starostnih skupinah v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=443).

Starostne skupine	Genotip HCV (št., %)			
	1	2	3	4
0-10 let	1 (100,0 %)	/	/	/
11-20 let	7 (29,2 %)	1 (4,2 %)	15 (62,5 %)	1 (4,2 %)
21-30 let	76 (39,2 %)	2 (1,0 %)	115 (59,3 %)	1 (0,5 %)
31-40 let	56 (52,8 %)	3 (2,8 %)	47 (44,3 %)	/
41-50 let	43 (74,1 %)	2 (3,4 %)	13 (22,4 %)	/
51-60 let	27 (87,1 %)	1 (3,2 %)	3 (9,7 %)	/
61-70 let	13 (81,3 %)	2 (12,5 %)	1 (6,3 %)	/
71-80 let	8 (80,0 %)	2 (20,0 %)	/	/
81-90 let	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	/	/
Skupaj	232 (52,4 %)	15 (3,4 %)	194 (43,8 %)	2 (0,4 %)

Kot je prikazano v Preglednici 5 so bili bolniki okuženi z genotipom 3 statistično pomembno mlajši od oseb okuženih z genotipom 1 ($p < 0,00001$). Statistične primerjave z bolniki okuženimi z genotipoma 2 in 4 nismo delali zaradi premajhnega števila oseb v teh dveh skupinah.

Preglednica 5: Povprečna starost bolnikov okuženih z različnimi genotipi HCV v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=443).

Genotip HCV	1 (n=232)	2 (n=15)	3 (n=194)	4 (n=2)
Povprečna starost +SD	39,1 ± 14,8	51,1 ± 22,8	29,5 ± 7,9	20,5 ± 3,53

4.4 RAZPOREDITEV GENOTIPOV HCV GLEDE NA DEJAVNIKE TVEGANJA OKUŽBE

Od vseh 443 oseb, katerim je bil določen genotip HCV, je bil dejavnik tveganja za okužbo s HCV poznan pri 247 osebah (55,7 %). Podatki za teh 247 oseb so prikazani v Preglednici 6. Največ okuženih oseb je bilo v skupini intravenskih uživalcev drog (185 oz. 74,9 % oseb, ki jim je bil določen genotip HCV in so imeli poznan dejavnik tveganja). V skupini intravenskih uživalcev drog jih je bilo največ okuženih z genotipom 3 (113 oseb, oz. 61,1 %) in nato z genotipom 1 (70 oseb, oz. 37,8 %) od tega s podtipom 1a 29 oseb (15,7 %) in podtipom 1b 19 oseb (10,4 %).

Preglednica 6: Razporeditev genotipov HCV glede na verjeten način okužbe s HCV v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=247).

Način okužbe s HCV	Genotip HCV				
	1	2	3	4	Skupaj
Intravensko uživanje drog	70 (37,8 %)	2 (1,1 %)	113 (61,1 %)		185 (74,9 %)
Prejem krvi in krvnih pripravkov	14 (77,8 %)	1 (5,6 %)	2 (11,1 %)	1 (5,6 %)	18 (7,3 %)
Spolni stik	5 (100 %)				5 (2,0 %)
Izpostavljenost pri delu v zdravstvu	3 (75 %)	1 (25 %)			4 (1,6 %)
Tetoviranje	1 (100 %)				1 (0,4 %)
Neznano	25 (73,5 %)	4 (11,8 %)	5 (14,7 %)		34 (13,8 %)
Skupaj	118 (47,8 %)	8 (3,2 %)	120 (48,6 %)	1 (0,4 %)	247

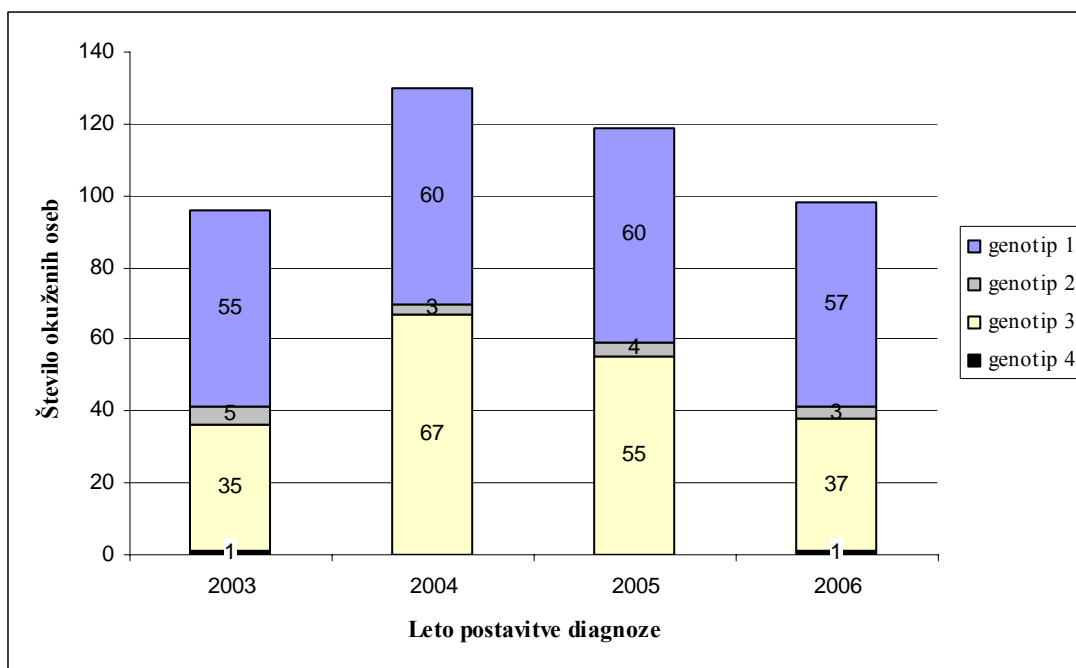
Druga največja skupina je bila skupina z neznanim dejavnikom tveganja (34 oseb, oz. 13,8 %), od katerih jih je bilo največ okuženih z genotipom 1 (25 oseb, oz. 73,5 %), med katerimi jih je bilo največ okuženih s podtipom 1b (21 oseb, oz. 61,8 % oseb z neznanim dejavnikom tveganja).

Prejemniki krvi in krvnih pripravkov so bili tretja največja skupina (18 oseb, oz. 7,3 %). Največ oseb iz te skupine je bilo okuženih z genotipom 1 (14 oseb, oz. 77,7 %).

Ostale skupine so imele v primerjavi z zgoraj naštetimi majhne deleže. Med 247 okuženimi je bilo 5 oseb, ki so okužile s spolnim stikom (2,0 %, vsi okuženi z genotipom 1), 4 zdravstveni delavci (1,6 %, 3 z genotipom 1 in 1 z genotipom 2) in 1 oseba, ki se je najverjetneje okužila s tetoviranjem (0,4 %, genotip 1).

4.5 SPREMEMBE V RAZPOREDITVI GENOTIPOV HCV V OPAZOVANEM OBDOBJU

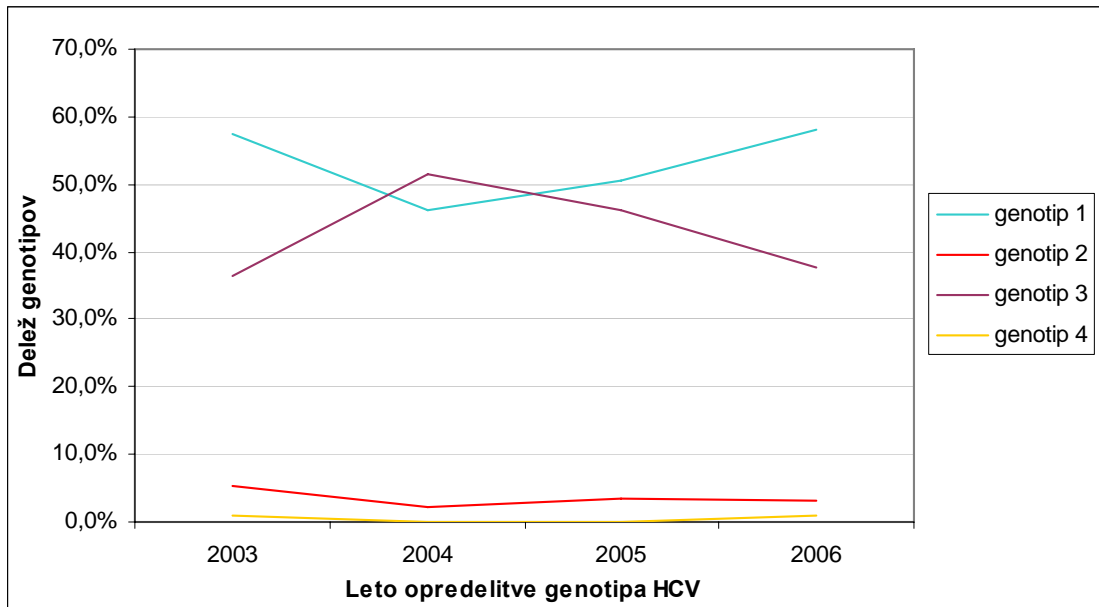
V obdobju od 01.01.2003 do 01.12.2006 je bil genotip HCV opredeljen pri 443 oseb. V tem obdobju so se deleži genotipov iz leta v leto bolj ali manj spreminjali. Število novo odkritih okuženih oseb je bilo v opazovanem obdobju za vsako leto enako, razen pri genotipu 3 je nihalo (Slika 5), kar pa je vplivalo na deleže posameznih genotipov na letni ravni.



Slika 5: Delež posameznih genotipov HCV v Sloveniji v letih 2003 – 2006 (n=443).

Delež genotipa 1 je v tem obdobju najprej padel iz 57,3 % na 46,2 % nato pa se je v letu 2006 spet dvignil na 58,2 %, kot je prikazano na sliki 6. Trend spreminjanja deleža genotipa 3 se je spreminjal obratno od genotipa 1, se pravi, da je najprej narasel (iz 36,5 % v letu 2003 na 51,5 % v letu 2004) in nato spet padel približno na stanje iz leta 2003 (37,8 % v letu 2006).

Delež genotipa 2 je v opazovnem obdobju nihal med 2 % in 5 %, delež genotipa 4 pa ni presegal 1 %. Trendi rasti in upadanja deleža genotipov so prikazani na sliki 6.



Slika 6: Trendi rasti in upadanja deležev genotipov HCV v Sloveniji v letih 2003 - 2006.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Virus hepatitisa C (HCV, angl. hepatitis C virus) je eden najpogostejših povzročiteljev vnetja jeter. V veliki meri okužbe s HCV preidejo v kronično obliko, ki se lahko razvije v cirozo jeter ali hepatocelularni karcinom (Boyer in sod., 2002). Tudi do 80 % okužb se lahko razvije v kronično okužbo (Morice in sod., 2006, Haushofer in sod., 2001). Posebnost oziroma nevarnost HCV se kaže v dolgotrajni nesimptomatični okužbi, ki se skozi leta v visokem deležu razvije v smrtno bolezen kroničnega hepatitisa C (Seeff, 1997).

Svetovna zdravstvena organizacija ocenjuje, da je okužene približno 3 % svetovne populacije, deleži okuženih pa so lahko od države do države različni (Gérard in sod. 2005). Tako naj bi bila prekuženost v Afriki 5,3 %, v vzhodnem Sredozemlju 4,6 %, v zahodnem Pacifiku 3,9 %, v obeh Amerikah 1,7 % in v Evropi 1,0 %, razlike znotraj teh regij pa lahko tudi zelo variirajo (Sy in sod., 2006, Schröter in sod., 2002). Ravno zaradi tako velikega števila oseb okuženih s HCV po vsem svetu, je zelo pomembno raziskati epidemiološke značilnosti okužbe s tem virusom.

Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete je bilo v obdobju od 1.1.2003 do 31.12.2006 odkritih 891 anti-HCV pozitivnih oseb. Večina teh oseb spada v eno od ogroženih skupin. Te skupine so intravenski uporabniki drog, prejemniki krvi in krvnih pripravkov, zdravstveni delavci in osebe, ki so se okužile s spolnimi stiki ali tetoviranjem. Pred uvedbo obveznega testiranja krvi na prisotnost anti-HCV protiteles je bil najpomembnejši vir okužbe prejetje krvi in krvnih pripravkov, z uvedbo obveznega presejalnega testiranja darovane krvi z občutljivimi encimsko imunskimi testi druge in tretje generacije pa se je incidenca hepatitisa C precej zmanjšala. Prejetje krvi in krvnih pripravkov tako ni več najpomembnejši dejavnik tveganja za okužbo s HCV, danes je najbolj pomemben dejavnik tveganja intravenska uporaba drog (Alter, 1997).

Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete v Ljubljani je bilo v obdobju od 1.1.2003 do 1.1.2006 odkritih 891 anti-HCV pozitivnih oseb. Odgovor zdravnikov o domnevnem dejavniku tveganja okužbe s HCV smo dobili za 441 oseb. Izmed vseh 891 anti-HCV pozitivnih oseb, jih je bilo daleč največ iz skupine intravenskih uporabnikov drog (344 oseb, 38,6 %). Druga pomembna skupina so bili prejemniki krvi in

krvnih pripravkov z 28 osebami, kar predstavlja 3,1 %. Oseb, ki so se okužile s spolnimi stiki je bilo odkritih 9 (1,0 %), zdravstvenih delavcev pa 4 (0,4 %). Tetoviranje je bilo kot dejavnik tveganja odkrito pri 3 osebah (0,3 %). Kljub prizadevanju zdravnikov pa je dejavnik tveganja okužbe ostal neznan pri 503 osebah (56,8 %). Za 450 od teh oseb podatkov nismo prejeli, za ostalih 53 oseb pa dejavniki tveganja niso znani, saj je šlo verjetno za manjše nesterilne kirurške ali zobozdravniške posege ali pa za še neznane načine prenosa.

5.1 RAZPOREDITEV GENOTIPOV HCV V SLOVENIJI

Oprelitev genotipa HCV je pomembna za epidemiološke raziskave, za razjasnitev načina prenosa in širjenja okužbe, za določitev sheme poteka in trajanja protivirusnega zdravljenja, za določitev trajanja kombiniranega zdravljenja z pegiliranim interferonom in ribavirinom ter za določitev doze ribavarina (Chevaliez in Pawlotsky, 2007). Določanje genotipa je pomembno tudi za ocenjevanje verjetnosti odziva pacienta na različna zdravila, saj je ponavadi odziv na terapijo pri osebah okuženih z genotipoma 1 in 4 slabši, kot odziv oseb okuženih z genotipoma 2 ali 3 (Bourliere in sod., 2002). Zato je opredelitev genotipa HCV ena od ključnih preiskav pred začetkom protivirusnega zdravljenja (Di Bisceglie in sod., 2002).

V obdobju med 1.1.2003 in 31.12.2006 je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete v Ljubljani odkritih 891 anti-HCV pozitivnih oseb. Med temi osebami jih je bilo 629 tudi RNA HCV pozitivnih, med temi osebami pa je bil genotip opredeljen pri 443 osebah. Genotipi so bili opredeljeni z metodo reverznega dot-blota, ki temelji na hibridizaciji odseka 5' nekodirajočega dela genoma HCV, pomnoženega s PCR, z 19 tipsko-specifičnimi sondami, vezanimi na nitrocelulozno membrano. Pri tem je bil uporabljen standardni test za genotipizacijo HCV INNO-LIPA HCV II (Innogenetics, Ghent, Belgija), ki je bil izbran v prvi slovenski raziskavi o genotipizaciji HCV v Sloveniji (Seme, 1997).

V opazovanem obdobju je bila v Sloveniji dokazana okužba z genotipom 1 pri 232 osebah (52,4 %), z genotipom 2 pri 15 osebah (3,4 %), z genotipom 3 pri 194 osebah (43,8 %) in okužba z genotipom 4 pri 2 osebah (0,4 %).

Rezultati podobnih raziskav izvedenih v evropskih državah se med seboj dokaj razlikujejo. V Nemčiji so, na primer, med 747 posamezniki dokazali okužbo z genotipom 1 pri 78 % oseb, kar je precej več kot pri nas (Schröter in sod., 2002). V Grčiji so med 1585 okuženimi posamezniki odkrili genotip 1 pri 46,9 %, genotip 3 pri 28,1 %, genotip 4 pri 13,2 % in genotip 2 pri 6,9 % oseb. Prevalenca genotipa 1 je podobna kot pri nas, ostale prevalence pa se precej razlikujejo (Katsoulidou in sod., 2006). V Belgiji so v podobni raziskavi ugotovili visoko prevalenco genotipa 1 (61,5 %), medtem ko so imeli genotipi 2, 3 in 4 precej podobne in nizke prevalences (od 11 % do 14 %) (Gérard in sod., 2005). V ZDA so v malce starejši raziskavi iz leta 2000 med 6807 okuženimi osebami prav tako dokazali precej visoko prevalenco genotipa 1 (73 %), okuženih z genotipom 2 je bilo 14 %, z genotipom 3 8 % in z genotipom 4 3 % (Blatt in sod., 2000). Avstrijska raziskava iz okolice Dunaja, ki je zajela le 250 okuženih oseb, je prišla do enako visoke prevalences genotipa 1 (74,8 %), genotip 2 je bil prisoten le pri 2,8 % okuženih, genotip 3 pri 16 %, genotip 4 pri 5,2 % in genotip 5 pri 0,4 % (Haushofer in sod., 2001). Tudi rezultati raziskave v severovzhodni Italiji niso bili preveč podobni našim rezultatom. Prevalenca genotipa 1 je bila sicer precej podobna (57,5 %), vendar pa je bila prevalenca genotipa 3 precej nižja (21,4 %) in prevalenca genotipa 2 precej višja (21,3 %), genotipa 4 pa sploh niso ugotovili. Rezultatom naše raziskave so še najbolj podobni rezultati raziskave na Hrvaškem, kjer so zajeli desetletno obdobje. Med 1163 osebami okuženimi s HCV so odkrili 58,8 % prevalenco genotipa 1 in 35,6 % prevalenco genotipa 3, genotipa 2 in 4 sta bila prisotna v zelo nizkih deležih, ostalih genotipov pa sploh niso ugotovili (Vince in sod., 2006).

Deleži genotipov HCV so precej različni tudi v starostnih skupinah. V naši raziskavi smo ugotovili, da je bila povprečna starost oseb okuženih s HCV genotipom 1 $39,1 \pm 14,8$ let, z genotipom 2 $51,1 \pm 22,8$ let, z genotipom 3 $29,5 \pm 7,9$ let in z genotipom 4 $20,5 \pm 3,53$ let. Bolniki okuženi z genotipom 3 so bili statistično pomembno mlajši ($29,5 \pm 7,9$ let) od oseb okuženih z genotipom 1 ($39,1 \pm 14,8$ let), statistične primerjave z bolniki okuženimi z genotipoma 2 in 4 pa nismo delali zaradi premajhnega števila oseb v teh dveh skupinah. Skoraj polovica bolnikov (45,7 %) z opredeljenim dejavnikom tveganja in genotipom HCV v Sloveniji, ki so bili okuženi z genotipom 3 je spadala med IVUD, tako da so naši rezultati v skladu z dokazano povezavo med IVUD in genotipom 3 in domnevo, da je epidemija okužbe s HCV v Sloveniji povezana predvsem z intravensko uporabo drog (Seme in sod., 2009).

Tudi v drugih evropskih državah so ugotovili, da so osebe okužene z genotipom 1 pomembno statistično starejše od oseb okuženih z genotipom 3. Tako so na primer v Avstriji v raziskavi iz okolice Dunaja ugotovili, da so bili pacienti z genotipom 1 statistično pomembno starejši (52,8 let) kot pacienti okuženi z genotipom 3 (37,2 let) (Haushofer in sod., 2001). Tudi v Severovzhodni Italiji so ugotovili, da so osebe okužene z genotipom 3 praviloma mlajše od oseb okuženih z genotipom 1 (Dal Molin in sod., 2002).

5.2 SPREMEMBE V RAZPOREDITVI GENOTIPOV HCV V OPAZOVANEM OBDOBJU

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je bil delež okuženih z genotipom HCV 1 v opazovanem obdobju v Sloveniji precej konstanten. Leta 2003 je bil le ta 57,3 %, v naslednjem letu je padel na 46,2 % in nato do leta 2006 spet zrasel na 58,2 %. Padeč deleža v letu 2003 je posledica povečanja števila novo odkritih oseb okuženih z genotipom HCV 3, saj je bilo število novo odkritih oseb, okuženih z genotipom HCV 1 skoraj konstantno. Delež genotipa HCV 3 je v opazovanem obdobju kazal obratni trend. Iz 36,5 % deleža v letu 2003 je naslednje leto zrasel na 51,5 %, nato je začel padati in v letu 2006 skoraj dosegel delež iz leta 2006 (37,8 %). Delež genotipa 2 je v opazovanem obdobju nihal med 2 % in 5 %, delež genotipa 4 pa ni presegel 1 %.

Do leta 1995 je bilo okuženih z genotipom 3 manj kot 20 % skupnega števila novo odkritih okuženih s HCV. V letu 2001 se je delež genotipa 3 povečal na 42,8 % in v letu 2002 že na 50,9 % vseh novo odkritih okuženih s HCV. Od leta 2002 do 2006 pa je ostal na približno isti ravni. Tudi delež genotipa 1 je bil v času pred našo raziskavo drugačen. Leta 1994 je imel delež 74,4 %, nato pa je začel padati, leta 1999 je imel manj kot 50 % delež, leta 2002 pa le še 46,3 %, vendar je nato leta 2003 spet zrasel na 56,1 % (Seme in sod., 2009). Genotip 2 je bil do leta 1995 odkrit pri približno 20 % novo okuženih oseb, nato je začel padati in v opazovanem obdobju ni presegel 5 %. Vzrok za porast deleža genotipa HCV 3 pri novo okuženih oseb je razširjanje le tega med populacijo IVUD, ki iz leta v leto predstavljajo večjo rizično skupino za okužbo s HCV. Zmanjšanje deleža genotipa HCV 1 med novo okuženimi pa je posledica uvedbe obveznega testiranja krvi in krvnih pripravkov v

devetdesetih letih prejšnjega stoletja, saj se je s tem dejavnikom tveganja predvsem razširjal podtip 1b.

V zahodni in centralni Evropi je razmerje med genotipi precej podobno kot pri nas. V Nemčiji je pred 25 leti prevladoval podtip 1b, ki ga je v naslednjih 10 do 15 letih nadomestil podtip 1a, sedaj pa se trend spet obrača in to proti podtipoma 3a in 4a (Schröter, 2002). Tudi v Grčiji je trend podoben, saj se je od leta 1970 do 1990 število okuženih s HCV podvojilo, k čemur je bistveno prispeval 13-kratni porast okuženih z genotipom 3 (Katsoulidou, 2006). V Belgiji so v raziskavi iz leta 2005 ugotovili, da je genotip 1a moč povezati tako s transfuzijo, kot tudi z intravensko uporabo drog, genotip 1b s starejšimi osebami in transfuzijo, genotip 3 pa z mlajšimi in IVUD. To se kar ujema s podatki, ki kažejo, da se je število okuženih z genotipom 1b v tem obdobju zmanjševalo povprečno za 2.3 % na leto. Poleg tega se je tudi število okuženih oseb mlajših od 50 let povečevalo za približno 3 % na leto in prav ti pacienti so povezani najbolj z genotipom 3 in intravensko uporabo drog (Gérard in sod., 2005).

V Franciji je genotip 1b od 1960-ih do 1990-ih upadel iz 47 % na 18,8 %, medtem ko sta deleža genotipov 1a in 3a v istem obdobju povečala iz 18 % na 28,8 % oziroma iz 15,3 % na 26,3 %, kar se ujema s podatki, ki kažejo, da je pogostost okužbe s transfuzijo krvi padla iz 48,7 % pred letom 1978 na 5,2 % po letu 1990 in da je pogostost okužbe z injiciranjem drog narasla iz 35,1 % na 54,8 % (Bourliere in sod., 2002). V SV Italiji in Rusiji so bili zaznani tudi podobni premiki deležev, kjer sta podtipa 1a in 3a skoraj popolnoma nadomestila genotip 2 in podtip 1b (Cantaloube in sod., 2005). Tudi na Hrvaškem so leta 2006 ugotovili, da je povečevanje deleža genotipa HCV 3 posledica povečevanja števila okuženih IVUD, ki so okuženi predvsem s podtipom 3a, posledično pa se zato manjša delež genotipa 1 (Vince in sod., 2006).

V prihodnosti lahko pričakujemo zvišanje deleža okuženih z genotipom 1 in 3 zaradi prenašanja teh genotipov v populaciji IVUD. Večina avtorjev s področja Evrope navaja podatke o večanju števila in relativnega deleža IVUD, ki pa so večinoma okuženi z genotipom 3 (Schröter in sod., 2002, Katsoulidou in sod., 2006, Gérard in sod., 2005, Haushofer in sod., 2001, Vince in sod., 2006). Pred 25 leti je bil najbolj pogost podtip 1b, pred 20 leti se je ravnovesje premaknilo proti podtipu 1a že zaradi prenašanja tega podtipa med IVUD, v zadnjem času pa je najbolj pogost genotip 3, ki se prav tako širi med IVUD in precej spreminja epidemiološko sliko.

5.3 SKLEPI

- V opazovanem obdobju je bila v Sloveniji najpogostejša okužba z genotipom HCV 1 (52,4 %), sledile so okužbe z genotipom 3 (43,8 %), genotipom 2 (3,4 %) in z genotipom 4 (0,4 %).
- Največji delež okuženih oseb v obdobju od 2003 do 2006 je bil v starostni skupini 21-30 let. 29,2 % bolnikov v tej starostni skupini je bilo okuženih s HCV genotipom 1 in 62,5 % s HCV genotipom 3, od katerih je večina IVUD.
- Bolniki okuženi z genotipom HCV 3 ($29,5 \pm 7,9$ let) so bili statistično pomembno mlajši od bolnikov okuženih s HCV genotipom 1 ($39,1 \pm 14,8$ let) ($p < 0,00001$).
- Med dejavniki tveganja za okužbo s HCV je v letih od 2003 do 2006 prevladovala intravenska uporaba drog (38,6 %).
- Okužba z genotipom 3 je bila značilno povezana z intravensko uporabo drog.

6 POVZETEK

Virus hepatitisa C je eden najpomembnejših povzročiteljev vnetja jeter. Pri večini okužb s HCV bolezen preide v kronično obliko, kar lahko privede do jetrne ciroze ali hepatocelularnega karcinoma. HCV se prenaša preko okužene krvi ali krvnih pripravkov, zato so najbolj izpostavljeni prejemniki okužene krvi in krvnih pripravkov in IVUD.

Obstaja več genotipov/podtipov HCV, ki se različno odzovejo na protivirusno zdravljenje. Opredelitev genotipa HCV je pomembna predvsem zaradi možnosti zdravljenja okužbe s HCV s primernimi odmerki zdravila in v raziskovanju epidemiologije okužbe s tem virusom, oziroma za natančno spremljanje ter razjasnitev načina prenosa in širjenja okužbe.

Namen naše raziskave je bil ugotoviti kakšna je razporeditev genotipov/podtipov HCV v Sloveniji, v obdobju od 2003 do 2006. Poleg tega smo želeli raziskati povezave med različnimi genotipi/podtipi HCV in načini okužbe ter ugotoviti spremembe v njihovih deležih.

V našo raziskavo smo vključili 891 anti-HCV pozitivnih oseb, ki so bili odkriti na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske Fakultete v Ljubljani v obdobju od 1.1.2003 do 31.12.2006. Odgovor zdravnikov o domnevnem dejavniku tveganja okužbe s HCV smo dobili za 441 oseb. Pri 629 osebah je bila odkrita tudi RNA HCV. Pri 443 osebah je bil opredeljen genotip HCV, 247 oseb pa je bilo s poznanim dejavnikom tveganja in z opredeljenim genotipom HCV.

Povprečna starost vseh okuženih s HCV v opazovanem obdobju v Sloveniji je bila 35,6 let. 65,4 % vseh okuženih je bilo moških s povprečno starostjo $34,7 \pm 13,2$ let, 33,4 % je bilo žensk s povprečno starostjo $37,4 \pm 17,1$ let.

Največ oseb okuženih s HCV v Sloveniji je bilo v opazovanem obdobju v starostni skupini 21-30 let (45,8 %). Intravenska uporaba drog je bila daleč najbolj pogost dejavnik tveganja za okužbo s HCV (38,6 %).

Pri 232 osebah (52,4 %) je bil ugotovljen genotip HCV 1, pri 194 osebah (43,8 %) je bil ugotovljen genotip 3, pri 15 osebah (3,4 %) genotip 2 in pri 2 osebah genotip 4 (0,5 %). Osebe okužene z genotipom 1 so bile statistično pomembno starejše ($39,1 \pm 14,8$ let) od oseb okuženih z genotipom 3 ($29,5 \pm 7,9$ let) ($p < 0,00001$).

7 VIRI

Alter M. J. 1997. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*, 26: 62-65.

Alter M. J., Handler S. C., Judson F. N. 1990. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *Journal of the American Medical Association*, 264: 2231-2235.

Armstrong G. L., Wasley A., Simard E. P., McQuillan G. M., Kuhnert W. L., Alter M. J. 2006. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Annals of Internal Medicine*, 144: 705-714.

Bellentani S., Pozzato G., Saccoccio G., Crovatto M., Croce L. S., Mazzoran L. 1999. Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: Report from the Dyonisos study. *Gut*, 44: 874-880.

Blatt L. M., Mutchnik M. G., Tong M. J., Klion F. M., Lebovics E., Freilich B., Bach N., Smith C., Herrera J., Tobias H., Conrad A., Schmid P., McHutchison J. G. 2000. Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in United States. *Journal of Viral Hepatitis*, 7: 196-202.

Bortolotti F., Resti M., Marcellini M., Giacchino R., Verucchi G., Nebbia G., Zancan L., Marazzi M. G., Barbera C., Maccabruni A., Zuin G., Maggiore G., Balli F., Vajro P., Lepore L., Molesini M., Guido M., Bartolacci S., Noventa F. 2005. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in 373 Italian children with HCV infection: changing distribution and correlation with clinical features and outcome. *Gut*, 54: 852-857.

Bourliere M., Barberin J. M., Rotily M., Guagliardo V., Portal I., Lecomte L., Benali S., Boustiere C., Perrier H., Jullien M., Lambot G., Loyer R., LeBars O., Daniel R., Khiri H., Halfon P. 2002. Epidemiological changes in hepatitis C virus genotypes in France: evidence in intravenous drug users. *Journal of Viral Hepatitis*, 9, 1: 62-70.

Boyer J. L., Chang E. B., Collyar D. E., Deleve L. D., Feinberg J., Judge T.A. 2002. National institutes of health consensus development conference statement: Management of hepatitis C. *Hepatology*, 36: 3-20.

Bradshaw C. S., Pierce L. I., Tabrizi S. N., Fairley C. K., Garland S. M. 2005. Screening drug users for sexually transmitted infections and blood borne viruses using street outreach and self collected sampling. *Sexually Transmitted Infections*, 81: 53-58.

Cantaloube J. F., Gallian P., Attoui H., Biagini P., De Micco P., de Lamballerie X. 2005. Genotype distribution and molecular epidemiology of hepatitis C virus in blood donors from southeast France. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 8: 3624-3629.

Chevaliez S., Pawlotsky J. M. 2007. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*, 13: 2461-2466.

Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244: 359-362.

Coste J., Reesink H. W., Engelfriet C. P., Laperchee S. 2005. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology: update to 2003. *Vox Sanguinis*, 88: 289-303.

Dal Molin G., Ansaldi F., Biagi C., D'Agaro P., Comar M., Crocè L., Tiribelli C., Campelo C. 2002. Changing molecular epidemiology of hepatitis C virus infection in northeast Italy. *Journal of Medical Virology*, 68: 352-356.

Di Biscioglie A. M., Hoofnagle J. H. 2002. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology*, 36: 121-127.

De Francesco R. 1999. Molecular virology of hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*, 31: 47-53.

Diepolder H. M., Hoffmann R. M., Gerlach J. T., Zachovel R., Jung M. C., Pape G. R. 1998. Immunopathogenesis of HCV infection. V: Hepatitis C virus. Reesink H. W. (ed.). 2nd ed. Basel, Karger: 135-151.

Dubuisson J. 2007. Hepatitis C virus proteins. *World Journal of Gastroenterology*, 13, 2406-2415.

Echevarria J. M., Pillar L., Pozo F., Avellón A. 2006. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996 – 2004). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24: 20-25.

Esteban J. I., Cordoba J., Sauleda S. 1998. The clinical picture of acute and chronic hepatitis C. V: Hepatitis C virus. Reesink H. W. (ed.). 2nd ed. Basel, Karger: 102-118.

Esteban J. I., Sauleda S., Quer J. 2008. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of Hepatology*, 48: 148-162.

Farci P., Alter H. J., Govindarajan S., Wong D. C., Engle R., Lesniewski R. R. 1992. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*, 258: 135-140.

Farci P., Shimoda A., Coiana A., Diaz G., Peddis G., Melpolder J. C. 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*, 288: 339-344.

Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Goncales F.L.Jr., Haussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J., Yu J. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*, 347: 975-982.

Gérard C., Delwaide J., Vaira D., Bastens B., Servais B., Wain E., Bataille C., Daenen G., Belaïche J. 2005. Evolution over a 10 year period of the epidemiological profile of 1,726 newly diagnosed HCV patients in Belgium. *Journal of Medical Virology*, 67: 503-510.

Glue P., Rouzier-Panis R., Raffanel C., Saho R., Gupta S. K., Salfi M. 2000. A dose-ranging study of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 32: 647-653.

Guadagnino V., Stroffolini T., Rapiceta M., Constantino A., Kondili L. A., Menniti-Ippolito F. 1997. Prevalence, risk factors and genotypes distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in southern Italy. *Hepatology*, 26: 1006-1011.

Haushofer A. C., Koptcy C., Hauer R., Brunner H., Halbmayer W. M. 2001. HCV genotypes and age distribution in patients of Vienna and surrounding areas. *Journal of Clinical Virology*, 20: 41-47.

Heydtmann M., Shields P., McCaughan G., Adams D. 2001. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Current Opinion on Infectious Diseases*, 14: 279-287.

Hoofnagle J. H. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, 36: 21-29.

Hoofnagle J. H. 1997. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology*, 26: 15-20.

Judd A., Hickmann M., Jones S., McDonald T., Parry J. V., Stimson G. V., Hall A. J. 2005. Incidence of Hepatitis C virus and HIV among new injecting drug users in London: prospective cohort study. *British Medical Journal*, 330: 24-25.

Kao J. H., Lai M. Y., Hwang Y. T., Yang P. M., Chen P. J., Shen J. C. 1996. Chronic hepatitis C without anti-hepatitis C antibodies by second-generation assay. A clinicopathologic study and demonstration of the usefulness of a third-generation assay. *Digestive Diseases Sciences*, 41: 161-165.

Kato N. 2001. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Medica Okayama*, 55: 133-159.

Katsoulidou A., Sypsa V., Tassopoulos N. C., Boletis J., Karafoulidou A., Ketokoglou 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. *Journal of Viral Hepatitis*, 13: 19-27.

Lehman M., Meyer M. F., Monazahian M., Tillmann H., L., Manns P. M., Wedemeyer H. 2004. High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection. *Journal of Medical Virology*, 73: 387-391.

Lešničar G. 2005. Pogostost incidentov pri zdravstvenih delavcih in drugih osebah na celjskem, njihovo preprečevanje in poizpostavitvena zaščita. *Zdravstveni vestnik*; 74: 211-220.

Leyssen P., De Clercq E., Neyts J. 2000. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 67-82.

Li X., Jeffers L. J., Shao L., Reddy K. R., de Medina M., Scheffel J., Moore B., Schiff E. R. 1995. Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *Journal of Viral Hepatitis*, 2: 227-234.

Lin C., Lindenbach B. D., Pragai B. M., McCourt D. W., Rice C. M. 1994. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *Journal of Virology*, 68: 5063-5073.

Linn H. H., Kao J. H., Hsu H. Y. 1994. Possible role of high-titer maternal viremia in perinatal transmission of hepatitis C virus from mother to infants. *New England Journal of Medicine*, 169: 638-641.

Luxon B.A., Grace M., Brassard D., Bordens R. 2002. Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C infection. *Clinical Therapeutics*, 24: 1363-1383.

Mathei C., Robaeys G., van Damme P., Buntinx F., Verrando R. 2005. Prevalence of hepatitis C in drug users in Flanders: determinants and geographic differences. *Epidemiology and Infection*, 133: 127-136.

Mazzeo C., Azzaroli F., Giovanelli S., Dormi A., Festi D., Colecchia A., Miracolo A., Natale P., Nigro G., Alberti A., Roda E., Mazzella G. 2003. Ten year incidence of HCV infection and frequency of spontaneous viral clearance. *Gut*, 52: 1030-1034.

Močilnik T. 2008. Ugotavljanje zgodnje okužbe z virusom hepatitisa C s presejalnim testiranjem z verižno reakcijo s polimerazo. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 64 str.

Mondelli M. U., Cerino A., Lisa A., Bramhilla S., Segagni L., Cividini A. 1999. Antibody responses to hepatitis C virus hypervariable region 1: evidence for cross-reactivity and immune-mediated sequence variation. *Hepatology*, 30: 537-545.

Morice Y., Cantaloube J. F., Beaucort S., Barbotte L., De Gendt S., Goncales F. L., Butterworth L., Cooksley G., Gish R. G., Beaugrand M., Fay F., Fay O., Gonzalez J. E., Martins R. M. B., Dhumeaux D., Vanderborght B., Stuyver L., Sablon E., de Lamballerie X., Pawlotsky J. M. 2006. Molecular epidemiology of hepatitis C virus subtype 3a in injecting drug users. *Journal of Medical Virology*, 78: 1296-1303.

Pawlotsky J. M. 1998. Hepatitis C virus infection: virus/host interactions. *Journal of Viral Hepatitis*, 5: 3-8.

Pawlotsky J. M. 2002. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*, 36: 65-73.

Payan C., Roudot-Thoraval F., Marcellin P., Bled N., Duverlie G. 2005. Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millennium: the GEMHEP GenoCII study. *Journal of Viral Hepatitis*, 12: 405-413.

Pereira B. J., Wright T. L., Schmid C. H., Levey A. S. 1995. A controlled study of hepatitis C transmission by organ transplantation. *Lancet*, 345: 484-487.

Podzorski R. P. 2002. Molecular testing in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 126: 285-290.

Poynard T., Ratziu V., Charlotte F., Goodman Z., McHutchison J., Albrecht J. 2001. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 34: 730-739.

Poynard T., Yuen M. F., Ratziu V., Lai C. L. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet*, 362: 2095-2100.

Purcell R. 1997. The hepatitis C virus: Overview. *Hepatology*, 26: 11-14.

Pujol F. H., Ponce J. G., Lema M. G., Capriles F., Deversa M, Sirit F. 1996. High incidence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in unit with high prevalence. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 273-278.

Ramos B., Núñez M., Toro C., Sheldon J., García-Samaniego J., Ríos P., Soriano V. 2007. Changes in the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes over time in Spain according to HIV serostatus: Implications for HCV therapy in HCV/HIV-coinfected patients. *Journal of Infection*, 54: 173-179.

Robotin M. C., Copland J., Tallis G., Coleman D., Giele C., Carter L., Spencer J., Kaldor J. M., Dore G. J. 2004. Surveillance for newly acquired hepatitis C in Australia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19: 283-288.

Ross R. S., Viazov S., Renzing-Köhler K., Roggendorf M. 2000. Changes in the epidemiology of hepatitis C infection in Germany: shift in the predominance of hepatitis C subtypes. *Journal of Medical Virology*, 60: 122-125.

Sanchez J. L., Sjogren M. H., Callahan J. D., Watts D. M., Lucas C., Abdel-Hamid M., Constantine N. T., Hyams C. K., Hinostroza S., Figueroa-Barrios R., Cuthie J. C. 2000. Hepatitis C in Peru: Risk factors for infection, potential iatrogenic transmission, and genotype distribution. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 63: 242-248.

Schröter M., Zöllner B., Schäfer P., Reimer A., Müller M., Laufs R., Feucht H.-H. 2002. Epidemiological dynamics of hepatitis C virus among 747 german individuals: new subtypes on the advance. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 5: 1866-1868.

Seeff L. B. 1997. The natural history of hepatitis C. *Hepatology*, 26: 21-28.

Seme K., Kovanda A., Vince A., Poljak M. 2009. Virus hepatitisa. V: *Medicinska mikrobiologija*. Uzunović-Kamberović. (ed.). Fojnica: Štamparija: 909-934.

Seme K. 1995. Virus hepatitisa C pri bolnikih z velikim tveganjem okužbe. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta in Biotehniška fakulteta: 89 str.

Seme K. 1997. Genomska tipizacija izolatov virusa hepatitisa C v Sloveniji. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 86 str.

Seme K., Poljak M. 1995. Use of commercial PCR kit for detection of hepatitis C. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 6: 549-552.

Seme K., Poljak M. 1996. Evaluation of Amplicor HCV Test: Our experiences after one year of routine use in a diagnostic laboratory. *Infection*, 24, 2: 140-143.

Seme K., Poljak M., Lešničar G., Brinovec V., Štepec S., Koren S. 1997. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Slovenia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 29: 29-31.

Seme K., Poljak M., Lešničar G., Močivnik M. 1996. Dialysis unit without hepatitis C virus infection in Slovenia. *Nephron*, 73: 322-322.

Seme K., Vrhovac M., Močilnik T., Matičič M., Lešničar G., Baklan Z., Meglič Volkar J., Rajter M., Štepec S., Lunar M., Poljak M. 2009. Hepatitis C virus genotypes in 1504 patients in Slovenia, 1993 to 2007. *Journal of Medical Virology*, 81: 634-639.

Shimizu Y. K., Feinstone S. M., Kohare M., Purcell R. H., Yoshikura H. 1996. Hepatitis C virus: detection of intracellular particles by electron microscopy. *Hepatology*, 23: 205-209.

Shoukry N.H., Grakoui A., Houghton M., Chien D.Y., Ghayeb J., Reimann K. A., Walker C. M. 2003. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 197: 1645-1655.

Simmonds P., Mellor J., Craxi A., Sandrez-Tapias J. M., Alberti A., Prieto J. 1996. Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients. *Journal of Hepatology*, 24: 517-524.

Stapleton J. T., Klinzman D., Schmidt W. N., Pfaller M. A., Wu P., La Brecque D. R. 1999. Prospective comparison in whole-blood as plasma-based hepatitis C virus RNA systems: improved detection using whole blood as the source of viral RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 484-489.

Sy T., Jamal M. 2006. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *International Journal of Medical Sciences*, 3, 2: 41-46.

Thimme R., Oldach D., Chang K. M., Steiger C., Ray S. C., Chisari F. V. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 194: 1395-1405.

Utsumi T., Hashimoto E., Okamura Y., Takayangi M., Nishikava H., Kigava M. 1995. Heterosexual activity as a risk factor for the transmission of hepatitis C virus. *Journal of Medical Virology*, 46:122-125.

Van der Poel C., Ebeling F. 1998. Hepatitis C virus: Epidemiology, transmission and prevention. V: Hepatitis C virus. Reesink H. W. (ed.). 2nd ed. Basel, Karger: 208-236.

Villano S. A., Vlahov D., Nelson K. E., Lyles C. M., Cohn S., Thomas D. L. 1997. Incidence and risk factors for hepatitis C among injection drug users in Baltimore, Maryland. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 3274-3277.

Vince A., Išič-Bes J., Zidovec Lepej S., Baca-Vrakela I., Bradarič N., Kurelac I., Vince D. B. 2006. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Croatia: A 10 year retrospective study of four geographic regions. *Collegium Antropologicum*, 30: 139-143.

Vrhovac M. 2003. Razporeditev genotipov virusa hepatitisa C v Sloveniji. Magistrska naloga. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 86 str.

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. *Journal of Virology*, 67: 3338-3344.

Wedemeyer H., He X. S., Nascimbeni M., Davis A. R., Greenberg H. B., Hoofnagle J. H. 2002. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Immunology*, 169: 3447-3458.

Weiner A. J., Geysen H. M., Christopherson C., Hall J. E., Mason T. J., Saracco G., Bonino F., Crawford K., Marion C. D., Crawford K. A. 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 3468-3472.

Yamada N., Tanihara K., Takada A., Yorihuzi T., Tsutsumi M., Shimomura H., Tsuji T., Date T. 1996. Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology*, 223: 255-261.

Zein N.N. 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 223-235.

Zhou D. X. M., Tang J. W., Chu. I. M. T., Cheung J. L. K., Tang. N. L. S., Tam J. S., Chan K. S. 2006. Hepatitis C virus distribution among intravenous drug users and the general population in Hong Kong. *Journal of Medical Virology*, 78: 574-582.