

Univerzita Karlova

1.lékařská fakulta



MUDr. Laura Krekulová, Ph.D.

Virová hepatitida C v rizikových populacích v České republice

Soubor uveřejněných vědeckých prací doplněný komentářem

Habilitační práce

Praha, 2020

Obsah

Poděkování	4
Abstrakt	5
Seznam nejčastějších zkratk	6
1. Úvod	8
2. HCV – etiologické agens	9
2.1. Popis HCV genomu	9
2.2. Nekódující oblasti genomu HCV	9
2.3. Kódující oblast genomu HCV	10
2.4. Replikační cyklus viru hepatitidy C	14
2.5. Genetická variabilita HCV	16
3. Přenos HCV infekce	18
4. Diagnostika HCV infekce.....	19
5. Výskyt virové hepatitidy C	20
5.1. Globální rozšíření virové hepatitidy C	20
5.2. Rozšíření virové hepatitidy C v ČR	22
5.3. Problematika užívání návykových látek v ČR.....	24
6. Virová hepatitida C – klinická manifestace	27
7. Léčba HCV infekce	30
7.1. Cíle léčby a historické rozdělení léčebné odpovědi	31
7.2. Vývoj a historie léčby virové hepatitidy C – éra interferonů.....	32
7.3. Nová virostatika v léčbě virové hepatitidy C	39
7.4. Léčba akutní HCV infekce	43
8. Globální eliminace HCV infekce.....	44
8.1. Plán globální eliminace HCV infekce v EU	44
8.2. Podmínky globální eliminace HCV infekce	45
8.3. Překážky plánované globální eliminace HCV infekce	46
9. Cíle práce	48
9.1. Zmapování výchozího stavu – stanovení genotypového zastoupení.....	48
9.2. Vyvinutí nové techniky HCV genotypizace a subtypizace	49
9.3. Sledování změn genotypového zastoupení v rizikové populaci	50
9.4. Komplexní péče – klíč k léčbě; vyloučené populace - klíč k eliminaci HCV.....	52
10. Závěr	Chyba! Záložka není definována.
11. Vybrané komentované publikace.....	55
12. Použitá literatura.....	56

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. MUDr. Aleši Žákovi, DrSc. a prof. MUDr. Radanovi Brůhovi, CSc. za dlouhodobou podporu a za možnost pedagogické práce na lékařské fakultě, která mne velmi obohacuje.

Poděkování patří také prof. Lee W. Riley, MD, za profesní inspiraci a celoživotní mentorství a též Cecilovi H. Hocky za morální a technickou podporu při práci v laboratořích UCB.

Děkuji velmi také prof. MUDr. Vladimírovi Vonkovi, DrSc. a doc. RNDr. Jitce Forstové, kteří podpořili moje nadšení pro virologii a povzbudili mne k dalšímu vzdělávání.

Velký dík mým rodičům a rodině za podporu a toleranci.

Závěrem patří poděkování také celé 1. LF UK, která mě vybavila konkurenceschopným vzděláním, naučila trpělivosti, pokoře a improvizaci. Ráda vrátím tento vklad do mého profesního života svou vlastní pedagogickou a vědeckou činností.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala také mým pacientům, bez nichž by většina prezentovaných prací nemohla vzniknout.

Abstrakt

Infekce virem hepatitidy typu C se v České republice v posledních desetiletích významně šíří převážně ve skupinách rizikově se chovajících osob. Práce je průřezem odborného zaměření autorky, která se s touto mezioborovou problematikou zabývá více než dvacet let.

Detailně je popsána struktura a funkce jednotlivých virových proteinů, které jsou základem pro pochopení patogeneze HCV infekce i fungování nových virostatik. Zavedení přímo působících antivirotik znamenalo v posledních letech zásadní přelom v přístupu k léčbě a otevřelo cestu k úvahám o možnostech eliminace této infekce.

Autorka přispěla ke stanovení genotypového zastoupení v infikované populaci v ČR na přelomu milénia. Ve zkoumané populaci byl detekován dominantně genotyp 1, bez ohledu na cestu přenosu infekce, čímž se naše populace signifikantně lišila od okolních zemí. Ještě před érou komerčních testů vyvinula novou diagnostickou techniku k záchytu a určení HCV genotypů a subtypů jedním vyšetřením.

V průběhu dalších dekád se jí podařilo zachytit a dokumentovat genotypový shift, který souvisel se změnou propagace epidemie HCV z obecné populace do rizikové skupiny injekčních uživatelů drog. Práci s rizikovou a obtížně léčitelnou skupinou věnuje autorka osobně velké úsilí, protože překážkou eliminace HCV ve vyspělých zemích včetně ČR je identifikace nemocných v rizikových skupinách a zvýšení jejich motivace k protivirové léčbě. Poslední z předložených původních prací ukazuje, že inovativní přístup k nemocným a přiblížení léčby k pacientům jsou možné cesty k úspěšné eliminaci HCV v souladu s vytyčeným plánem WHO.

Abstract

Over the last decades infection with hepatitis C virus has been spread mainly within the groups with risk behavior. This is an overview of author's scientific focus in this interdisciplinary field for more than 20 years.

Structure and functions of viral proteins are described in detail as basic prerequisite for understanding the natural history of HCV infection, as well as the mode of action of particular novel antivirals. Introduction of directly acting antivirals over the last years has become a major breakthrough in the treatment and it sparked the idea of global HCV elimination.

Author (Dr. Krekulova) contributed to the precise description of genotype distribution in the infected population of the Czech Republic at the beginning of the new millennium. Regardless of the presumed mode of transmission, genotype 1 was detected as dominating, which was significantly different from other countries. At that time, before the era of commercial tests, she developed a novel diagnostic technique to detect HCV RNA and distinguish its genotypes and subtypes with one single assay.

Over the following decades she documented HCV genotype shift resulting from the change in HCV infection spread, originally from common population, in the risk group of injecting drug users. The author pays the most of personal attention to direct interaction with this hard to access group of patients. Nowadays the greatest challenge is to identify those infected and to motivate them into the antiviral treatment. The last of the presented papers brings an example of innovative approach to increase the access to antiviral treatment as a possible road to successful elimination of HCV within the WHO proposed plan.

Seznam nejčastějších zkratk

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome - syndrom získaného selhání imunity
AK	aminokyselina
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
ČR	Česká republika
DAA	directly acting antivirals – přímo působící virostatika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EASL	European Association for the Study of the Liver - Evropská asociace pro studium jater
ELISA	enzyme linked immunosorbent assays
ER	endoplasmatické retikulum
EU	Evropská unie
HCC	hepatocelulární karcinom
HCV	virus hepatitidy C
HBV	virus hepatitidy B
HIV	Human Immunodeficiency Virus - virus lidské imunodeficience
HVR	hypervariable region
IFN	interferon
IRES	internal ribosomal entry site
ISDR	interferon alfa sensitivity-depending region
kDa	kilo Dalton
MSM	muži mající sex s muži
NI	nukleos(t)idové inhibitory
NK buňky	natural killer - cytotoxické buňky imunitního systému
NMS	Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti
NNI	nenukleos(t)idové inhibitory
NRL	Národní referenční laboratoř
ORF	open reading frame - otevřený čtecí rámec
OST	opioid substitution treatment – opiátová substituční léčba
PEG-IFN	pegylovaný interferon

PI	proteázové inhibitory
PCR	polymerázová řetězová reakce
PWID	people who inject drug - osoby injekčně užívající drogy
RdRp	RNA dependentní RNA polymeráza
RNA	ribonukleová kyselina
VHA	virová hepatitida typu A
VHB	virová hepatitida typu B
VHC	virová hepatitida typu C
WHO	World Health Organization – Světová zdravotnická organizace
SVR	sustained virological response - setrvalá virologická odpověď
SZÚ	Státní zdravotní ústav

1. Úvod

Virová hepatitida C je infekční onemocnění, o jehož existenci víme díky rozvoji metod molekulární virologie od roku 1988. Před objevem etiologického agens byla onemocnění jater způsobená v té době neznámým virem zahrnována mezi tzv. nonA nonB hepatitidy. Virus hepatitidy C (HCV) byl objeven týmem Michaela Houghtona ve spolupráci s laboratoří Daniela Bradleyho. První publikace dokumentující existenci nového hepatotropního viru je z roku 1989, průlomový objev publikoval Choo a spolupracovníci¹.

Virus hepatitidy C patří k evolučně velmi úspěšným lidským patogenům. Tímto lidským flavivirem jsou po celém světě a na všech kontinentech infikovány desítky miliónů osob, více než polovina nemocných o své infekci neví^{2,3,4,5,6}. Podle odhadů WHO (World Health Organization – Světová zdravotnická organizace) z roku 2013 bylo infikováno 185 milionů lidí, 130-150 miliónů lidí bylo ve stádiu chronické HCV⁷. Poslední zveřejněná data WHO z roku 2017 počítají s 71 milióny osob žijících na světě s chronickou HCV infekcí^{8,9}. Významný rozdíl mezi jednotlivými odhady dokumentuje, jak obtížné je určit počet chronicky nemocných. Onemocnění se vyskytuje na celém světě s velkou variabilitou četnosti výskytu v jednotlivých oblastech či regionech⁹. V souladu s WHO jsou také poslední zveřejněné údaje EASLu (European Association for the Study of the Liver - Evropská asociace pro studium jater) z roku 2018. Chronicky infikovaných je asi 1 % světové populace¹⁰. Jedná se o násobek rozsahu pandemie HIV/AIDS¹¹. Kolem 2,3 milionů osob na světě trpí koinfekcí HCV + HIV, 1,36 miliónů koinfikovaných udává jako pravděpodobný zdroj nákazy injekční aplikaci drog. Jaterní onemocnění je v současné době jednou z hlavních příčin morbidity a mortality HIV pozitivních pacientů.

Přestože se zlepšila informovanost veřejnosti, zvýšila se úroveň zdravotní péče, bezpečnost krevních transfuzí a bylo zavedeno používání jednorázových pomůcek k aplikaci injekcí i v zemích s nižším socioekonomickým standardem, bylo v roce 2017 zachyceno 1,75 milionů nových HCV infekcí, s globální incidencí 23,7 na 100 000⁸. V Evropě s incidencí 61,8 na 100 000 obyvatel dochází k šíření HCV infekce zejména mezi osobami, které si injekčně aplikují drogy^{10,12}.

Virus hepatitidy C je geneticky velmi variabilní, poslední mezinárodní klasifikace popisuje 7 základních genotypů a desítky subtypů. Na jednotlivých kontinentech je zastoupení genotypů viru hepatitidy C odlišné⁷.

Průběh chronické HCV infekce je odlišný mezi jednotlivými pacienty: od nekomplikované, bezpříznakové a spontánně eliminované infekce až po různě aktivní chronické onemocnění, které může vést k jaterní cirhóze a následným život ohrožujícím komplikacím, včetně rozvoje portální hypertenze a hepatocelulárního karcinomu.

Dopady takto rozsáhlé epidemie jsou značné, komplikace jaterní cirhózy vzniklé v důsledku chronické HCV infekce jsou v současné době ještě stále nejčastější příčinou transplantace jater v USA a vyspělých evropských zemích¹³. Podle odhadů WHO v roce 2015 zemřelo na následky chronických virových hepatitid B a C asi 1,34 milionů osob. To je mnohem více než počet úmrtí na HIV/AIDS. Počet úmrtí spojených s chronickou virovou hepatitidou je srovnatelný s počtem úmrtí na tuberkulózu.

Aby nedocházelo k závažným pozdním komplikacím a úmrtím je důležité infikované osoby časně diagnostikovat a léčit. V posledních pěti letech jsou k dispozici velmi účinná a bezpečná virostatika s minimem nežádoucích účinků. Léčba moderními léky vede k eliminaci viru hepatitidy C z organismu ve více než 95 % případů⁸.

Problémem zůstává nedostatečná dostupnost testování a následné léčby HCV infekce v některých regionech a pro určité skupiny rizikově se chovajících osob. Odhaduje se, že HCV infekce je diagnostikována jen u 20 - 30 % ze všech infikovaných.

Do roku 2015 se celosvětově kumulativně léčilo asi 5,5 milionu osob. V roce 2015 zahájilo léčbu HCV infekce 1,1 milionů nemocných, tedy asi 7 % diagnostikovaných (opět s významnými rozdíly v dostupnosti léčby mezi jednotlivými zeměmi a regiony). Přibližně polovina pacientů se léčila novými léčebnými režimy⁹. Léčených však bylo méně, než byl počet nově diagnostikovaných HCV infekcí v daném roce. Celosvětová epidemie virové hepatitidy C tedy dále expanduje a narůstá na závažnosti. Je jasné, že bez efektivních globálních a regionálních preventivních, diagnostických a léčebných strategií se ji nepodaří usměrnit a dostat pod kontrolu.

Příběh této choroby dokumentuje, jak úspěšné může být spojení základního výzkumu (molekulárně virologického a farmaceutického) a klinické praxe. Od roku 2015, tedy po méně než 30 letech od objevu infekčního agens můžeme, díky společnému úsilí lékařů, virologů, farmakologů a dalších vědců, uvažovat o eliminaci HCV infekce jako o reálném řešení této pandemie. Virová hepatitida C může být příběhem se šťastným koncem, pokud se podaří koordinovat léčebné strategie jednotlivých států a pokud bude dostatek finančních prostředků k realizaci plošné léčby infikované populace.

2. HCV – etiologické agens

2.1. Popis HCV genomu

Virus hepatitidy C (HCV) je obalený jednovláknový RNA virus. Velikost virové partikule je 55-65 nm. Genomová virová RNA má pozitivní polaritu. HCV taxonomicky řadíme do čeledi Flaviviridae, je dosud jediným členem rodu *Hepacivirus*. Dalšími lidskými patogeny v této čeledi jsou třeba virus dengue a virus žluté zimnice¹⁴.

Velikost HCV genomu je přibližně 9600 nukleotidů, různé izoláty HCV genomů mají odlišnou délku¹⁴. Genom HCV se skládá z nekódujících 5' a 3' oblastí a centrálního kódujícího regionu. Jedná se o relativně malý RNA virus, proto jeho proteiny zpravidla zastávají více než jednu funkci v replikačním cyklu a interakcích s hostitelskou buňkou.

2.2. Nekódující oblasti genomu HCV

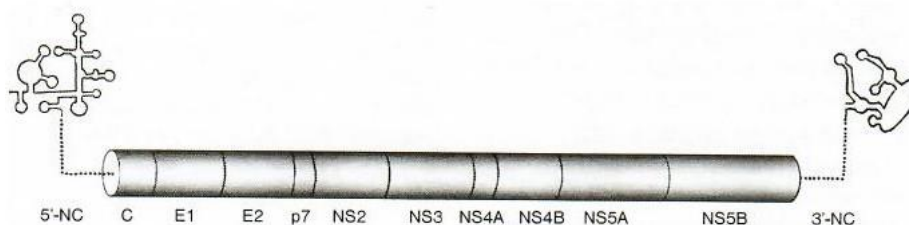
5'-NC

Pozoruhodná je již 5'koncová nekódující oblast, která patří v rámci HCV genomu k nejvíce stabilním úsekům. Proto je tento úsek často využíván k diagnostice HCV infekce metodou polymerázové řetězové reakce, ať se jedná o kvalitativní stanovení či genotypizaci, tedy určení jednotlivých genotypů nebo subtypů^{15,16}. Tato vysoce konzervativní oblast, označovaná v literatuře též jako 5'-UTR, 5'-NTR nebo 5'-NC, o délce 341-344 nukleotidů slouží i k navázání virové HCV RNA na ribozomální aparát hostitelských buněk. 5'-NC bezprostředně navazuje na iniciační metioninový kodon (AUG) otevřeného čtecího rámce kódující oblasti HCV RNA. HCV genom postrádá na svém 5' konci metylaci, tzv.

metylovou čapku. Součástí nekódující oblasti 5'-NC je IRES (internal ribosomal entry site). Jedná se o úsek přibližně mezi 40 a 355 nukleotidem, který má složitou sekundární strukturu s minimálně sedmi vláskami^{17,18}. IRES umožňuje iniciaci translace nezávisle na metylové čapce. Mnohočetnými intermolekulárními kontakty dochází k přímé vazbě 40S ribozomální podjednotky a translačního iniciačního faktoru eIF3 na přesně vymezené oblasti IRES^{19,20}. Díky IRES se ribozomy hostitelské buňky naváží v těsné blízkosti začátku oblasti kódující virové proteiny u iniciačního AUG kodonu prakticky bez skenování²⁰ a zajistí správné umístění AUG kodonu na ribozomu a zahájení translace, bez nutné spoluúčasti dalších buněčných translačních iniciačních faktorů (např. eIF4A, eIF4B, eIF4F, atd.)²¹. IRES je kritickou oblastí pro virovou replikaci a infekciozitu HCV^{22,23,24}. Schopnost zahájit translaci bez nutné přítomnosti dalších iniciačních faktorů je unikátní mezi RNA biologickými systémy. Mezi eukaryotickými buňkami nemá ekvivalent. Podobné binární komplexy jsou popsány pouze u prokaryot²⁵.

3'-NC

3'- koncová nekódující oblast, nacházející se v HCV genomu za polyprotein kódující oblastí byla objevena až po sedmi letech od objevu HCV, tedy v roce 1996^{26,27}. Tato oblast má rovněž složitou sekundární strukturu. 3'-NC oblast můžeme základně rozdělit na 3 úseky: krátkou variabilní doménu, polyuridine-polyypyridinovou doménu a na vysoce konzervativní doménu, označovanou též jako X-tail²⁷. Dvě posledně jmenované domény jsou pravděpodobně zásadní pro infekciozitu HCV. 3'-NC interaguje s celou řadou proteinů hostitele, včetně PTB (polypyrimidine tract binding protein, PTB). Právě tato interakce zvyšuje translační aktivitu genomické RNA. X-tail je též zásadní element pro zahájení syntézy negativního vlákna při virové replikaci²⁸. 3'- NC úsek genomové HCV RNA obsahuje i vlásenku (hairpin). Předpokládáme, že tato část genomu může být využita jako autoiniciační templát pro extenzi virové RNA²⁹.



Obrázek 1 Schéma genomu HCV (převzato z KREKULOVÁ, Laura a Vratislav ŘEHÁK. *Virové hepatitidy: prevence, diagnostika a léčba*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4218-4³⁰).

2.3. Kódující oblast genomu HCV

Kódující oblast genomu, která se nachází mezi 5'-NC a 3'-NC oblastmi, dělíme dále na část kódující strukturální proteiny a oblasti nesoucí informace pro nestrukturální bílkoviny. Celá kódující oblast je přepisována z jednoho otevřeného čtecího rámce (open reading frame - ORF). Po přepisu (translaci) tak vzniká jeden polyprotein o délce kolem 3000 aminokyselin^{14,31}. Ten je následně opracován pomocí enzymatického aparátu hostitelské buňky i vlastních virových proteáz a postupným proteolytickým štěpením vznikají finální virové strukturální a nestrukturální bílkoviny. Genetické informace pro strukturální proteiny jsou umístěny na začátku (5'-konci) kódující oblasti, v regionech C, E1, E2 a p7. Oblast nesoucí informace pro nestrukturální bílkoviny dělíme dále na regiony NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B.

Funkce malého virového proteinu p7, který je přepisován ze stejnojmenného lokusu nebyla dlouho jasná. V současné době ho řadíme mezi strukturální proteiny a již víme, že jeho 2 domény vytvářejí iontový kanál.

Strukturální proteiny

Core protein

Core protein je vysoce konzervativní bílkovina o molekulární hmotnosti asi 21kDa, ze které je složena virová nukleokapsida. Během replikace HCV je odštěpen z velkého polyproteinu jako první. Štěpení mezi core proteinem a následujícím E1 zajišťuje signální peptidáza, která je lokalizovaná v ER (endoplazmatickém retikulu) hostitelských hepatocytů. Core protein je možno detekovat ve 2 respektive ve 3 základních formách o hmotnosti 21 kDa, 19kDa a 16 kDa³². Nejmenší forma core proteinu nevzniká sestřihem, jak se původně předpokládalo, ale přímo translací ze sekundárního (alternativního) ORF³³. Větší proteiny 21 a 19 kDa jsou v HCV infikovaných hostitelských buňkách lokalizované převážně na membránách ER, zatím co nejmenší protein 16kDa se nachází hlavně v perinukleárním prostoru³². Z toho je patrné, že core protein není „jen“ bílkovinou tvořící nukleokapsidu, ale má mnoho dalších funkcí v rámci replikačního cyklu a interakcí HCV s hostitelskou buňkou. Poměr jednotlivých core proteinů (16, 19 a 21 kDa) stejně jako jejich konkrétní lokalizace v hostitelském hepatocytu souvisí s transformací této buňky³⁴.

Core protein lze rozdělit do tří domén. První doména, která váže virovou RNA, obsahuje vysoký poměr zásaditých zbytků. Druhá doména je více hydrofobní než první úsek a její C-terminální konec je identický s C-koncem produktu p21. Třetí doména slouží jako signální sekvence pro E1 protein^{35,36}.

Core protein se váže k membránám endoplazmatického retikula hostitelské buňky, k lipidovým inkluzím, mitochondriím a buněčnému jádru. Tato bílkovina přímým i nepřímým mechanismem potencuje maligní zvrát hepatocytů a rozvoj steatózy³⁷. Rovněž ovlivňuje funkce hostitelské buňky jako je transkripce, metabolismus lipidů a například i apoptózu. Je zásadní pro tvorbu nových virionů^{38,39}. Multimerizace core proteinů vede k vytvoření nukleokapsidy a kompletizaci virové partikule. Pro vzájemnou interakci je podle většiny autorů esenciálních prvních 115 AA na N-konci C proteinu; interaktivní doména je mezi aminokyselinovými zbytky na pozicích 36-91 a částečně se kryje s doménou pro vazbu RNA na ribozom³⁶. Vazba core proteinu s 60S ribozomovou podjednotkou pravděpodobně reguluje i odláštění virionu.

Core protein ovlivňuje také metabolismus železa v hepatocytech⁴⁰ a je považován za induktor vzniku inzulinové rezistence u pacientů chronickou hepatitidou typu C^{41,42}. Vazba core proteinu s tukovými kapénkami a apolipoproteinem II vysvětluje experimentálně doloženou schopnost této bílkoviny indukovat steatózu u transgenních myší⁴³. Vznik jaterní steatózy pozorujeme též v klinické praxi u infikovaných osob. Indukce steatózy je genotypově variabilní, největší prosteatotický potenciál má HCV genotyp 3a^{44,45}.

E1E2

Virový obal je složen ze dvou glykoproteinů E1 (30-35kDa) a E2 (70-72kDa). Tyto obalové (envelope) bílkoviny jsou vysoce glykosylované a mají zásadní roli při průniku virové částice do hostitelské buňky. E1 je zodpovědná za fúzi virové partikule a buněčného obalu napadené hostitelské buňky, na svém N-konci má 4-5 glykanů. E2 funguje jako vazebná receptorová podjednotka, na svém N konci má kolem 11 glykosylačních pozic. Počet těchto pozic je odlišný pro různé genotypy a hraje důležitou roli pro formování virového obalu HCV, E1E2 komplexu a interakcí receptorů s virovou partikulí. Je popsána nekovalentní interakce E1 a E2, díky které dochází k vytvoření přirozených heterodimerů, které se následně podílejí na vzniku virového obalu. Současně byly dokumentovány i E1E2 komplexy vázané disulfidovou vazbou⁴⁶. Obalový protein E2 interaguje s buněčným receptorem CD81 a s receptory pro

HDL (high density lipoprotein)⁴⁷. V experimentu bylo prokázáno, že solubilní formy CD81 mohou inhibovat vstup uměle vytvořené HCV pseudopartikule (HCV pp) do hostitelských buněk⁴⁸.

E2 protein obsahuje 2 hypervariabilní oblasti (hypervariable regions HVR): HVR 1 a HVR 2, které vykazují vysokou frekvenci mutací, neboť jsou cílem neutralizačních protilátek. Jejich hypervariabilita znemožňuje neutralizaci HCV protilátkami hostitele a E2 se tak mimo jiné podílí i na vysokém procentu chronických HCV infekcí^{49,50}. Fakt, že HCV glykoproteiny jsou lokalizovány výhradně na membránách endoplazmatického retikula a prakticky nejsou detekovatelné na plazmatické membráně infikované buňky, koresponduje s poznatkem, že HCV je, stejně jako ostatní zástupci čeledi Flaviviridae, z hostitelských buněk uvolňován pučením z endoplazmatického retikula a následnou exocytózou.

P7

P7 protein je polypeptid tvořený z 63 aminokyselin. Sestřih p7 umožňuje peptidázy hostitelské buňky. P7 tvoří dvě transmembránové domény, lokalizované v endoplazmatickém retikulu (ER). Spolu vytváří iontový kanál, který je důležitý pro infekciozitu HCV^{51,52}. Podporuje například translokaci nestrukturálního proteinu NS2 do ER hostitelských hepatocytů, kde následně probíhá jeho další štěpení. HCV p7 má podobné vlastnosti jako proteiny ze skupiny viroporinů, je zásadní pro složení kompletní virové partikule a uvolnění zralých virových částic z infikované buňky hostitele⁵³.

Nestrukturální virové proteiny

NS2

NS2 protein je transmembránový protein o velikosti 21-23 kDa, který je zásadní pro kompletaci virové partikule⁵⁴. Na C- konci této bílkoviny se nachází doména s proteázovou aktivitou, zodpovědná za štěpení NS2/3. Jedná se o oblast mezi 827. a 1207. aminokyselinovým zbytkem⁵⁵. Na autoproteázové aktivitě participuje krom výše zmíněné C terminální domény NS2 i N- terminální úsek následujícího virového nestrukturálního proteinu, tedy NS3. Štěpení v oblasti NS2/NS3 je první posttranslační autokatalytické štěpení nově syntetizovaného, virového polyproteinu⁵⁶.

NS2-3 proteáza byla nazývána metaloproteázou, neboť exogenní zinek stimuluje její aktivitu a chelační činidla, jako například EDTA vedou k inhibici. Novější práce však prokázaly, že zinek „pouze“ stabilizuje strukturu aktivního místa NS3 podjednotky^{57,58}.

NS3

NS3 protein viru hepatitidy C o molekulové hmotnosti 67kDa je podobně jako NS3 protein flavivirů složený ze dvou hlavních domén. Při N konci je lokalizována proteázová doména, zabírající zhruba 1/3 lokusu. Navazující 2/3 při C konci zaujímá NTPázo/helikázová doména^{59,60}.

Serinová proteáza na N konci je zásadní enzym pro infekciozitu HCV, je zodpovědná za ko- a posttranslační štěpení dalších, nestrukturálních proteinů. Konkrétně jde o štěpení v oblastech NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A a NS5A/5B. Katalytická aktivita je podmíněna přítomností 3 aminokyselinových zbytků: histidinu na 1083 pozici, kyseliny asparagové na 1107 a serinu na 1165 pozici. Jejich záměna alteruje štěpný potenciál celého enzymu^{61,62}.

Štěpení NS3/4A je cis, všechna ostatní jsou trans štěpení. NS4A protein je kofaktorem serinové proteázy a je esenciální pro všechna výše uvedená štěpení s výjimkou NS5A/5B. Struktura NS3 HCV proteázy je velmi podobná struktuře ostatních členů trypsinové nadrodiny proteáz⁶³.

Oblast při C-konci NS3 lokusu má aktivitu RNA helikázy a nukleosid trifosfatázy. HCV NS3 helikáza je členem Asp-Glu-Cys- His podskupiny takzvaných DEAD box helikáz. Její ATPázová aktivita je

stimulována jednovláknovými ribonukleovými kyselinami. Tato helikáza rozplétá mono- a heteroduplexy ve směru 3'-5'. Pro její aktivitu je nezbytná přítomnost iontů Mg^{2+} či Mn^{2+} a ATP.

Mutace NS3 oblasti, které alterují helikázovou aktivitu vedou k ovlivnění infekciozity in vitro. Helikáza je zásadní pro virovou translaci a replikaci. Kromě již popsané role při replikaci HCV a jeho posttranslačních úpravách má NS3 protein ještě další funkce, které ovlivňují pochody v hostitelských buňkách. NS3 například inhibuje fosforylaci mediovanou cAMP-dependentní protein kinázou (protein kináza A-PAK) a tím i transdukcí signálu přenášeného touto cestou⁶⁴. Pochopení molekulárních mechanismů NS3 helikázy umožnilo vývoj nových specificky působících virostatik^{65,66,67,68,69,70}.

NS4A

NS4A je malý nestrukturální virový protein o molekulární hmotnosti 8kDa složený z 54 aminokyselinových zbytků. NS4A je esenciální kofaktor pro funkci NS3 proteázy⁷¹, jeho přítomnost je nezbytná pro posttranslační úpravy velkého virového polyproteinu⁷². Aktivní místo je lokalizováno v centrální části NS4A proteinu v rozmezí asi 12 aminokyselinových zbytků. Koncových 20 aminokyselinových zbytků vytváří transmembránovou kotvu, která stabilizuje NS3/NS4A komplex na membránách ER. Interakce mezi NS3 a NS4A vede k aktivaci štěpného místa NS3 proteázy. Přítomnost NS4A je též nutná k fosforylaci NS5A⁷³.

NS4B

NS4B je malý hydrofobní protein (27kDa), obsahuje 4 transmembránové domény. NS4B spolupůsobí s NS4A a tím nepřímo ovlivňuje i NS3 a NS5A⁷⁴. Nestrukturální protein NS4B indukuje morfologické změny v ER, vedoucí ke vzniku tzv. membránového webu (membránové sítě MW). Zde se pak pravděpodobně zformuje replikační komplex⁷⁵. Kromě vlastní replikace RNA (její vazbou a tvorbou replikačního komplexu) se NS4B podílí i na procesu maturace virionu a enkapsidaci^{76,77}.

NS5A

NS5A je hydrofilní protein, který hraje důležitou roli při replikaci HCV, ovlivňuje buněčnou signalizaci a také odpověď na interferon. Nemá transmembránové domény, vazbu na membrány zajišťuje unikátní alfa šroubovice lokalizovaná na jeho N konci^{78,79}. Mutace v oblasti této šroubovice vede k uvolnění vazby na membránu a zabraňuje tvorbě replikačního komplexu HCV⁸⁰ a tak zásadně ovlivňuje replikaci HCV.

NS5A se vyskytuje minimálně ve dvou formách o molekulové hmotnosti 56 a 58kDa. Původně se předpokládalo, že odlišné formy vznikají rozdílnou proteolýzou, podle experimentálně podložených pozorování jsou ale výsledkem odlišné fosforylace. NS5A je fosforylován zejména na serinových zbytcích, částečně též na threoninu. Okrsky hyperfosforylace byly zmapované deleční analýzou. Nacházejí se hlavně v centrální části NS5A mezi AK 2200 a 2500⁸¹. Konkrétní lokusy, kde k fosforylaci dojde, jsou pro jednotlivé HCV izoláty odlišné⁸². Ovlivnění NS5A fosforylace je multifaktoriální a podílí se na něm prakticky všechny nestrukturální proteiny lokalizované v ORF nad NS5A, tedy směrem k 5'konci čtecího rámce.

V NS5A kódujícím regionu, konkrétně mezi aminokyselinovými zbytky 2209 až 2248, se nachází oblast označovaná jako ISDR (interferon alfa sensitivity-depending region). Tento úsek vzbuzoval, zejména v době interferonových léčebných režimů (viz dále v textu kapitola Léčba HCV infekce), značnou pozornost nejen virologů, ale i kliniků. ISDR přímo interaguje s IFN alfa stimulovaným genovým produktem PKR protein kinázou. Ta je aktivována vazbou na dvouvláknovou RNA což vede k zastavení proteosyntézy. Sekvence ISDR byly před érou DAA využívány k predikci léčebné odpovědi na IFN režimy^{83,84,85,86}. NS5A interaguje s celou řadou buněčných proteinů a ovlivňuje tak mitotickou aktivitu, pro- i anti- apoptotický efekt, transformaci hepatocytů a vznik hepatocelulárního karcinomu (HCC)⁸⁷.

Výše popsaná pozorování upozorňují na velmi aktivní roli, kterou NS5A hraje při HCV replikaci⁸⁸. Modulační funkce NS5A fosforylací je regulačním mechanismem minimálně jednoho kroku HCV replikace⁸⁹.

NS5B

NS5B je poslední v řadě nestrukturálních virových proteinů, nachází se na 3' konci ORF. Tento hydrofilní protein o molekulové hmotnosti 65kDa nese GDD motiv (tedy sekvenci Gly-Asp-Asp) společný pro všechny virové RNA dependentní RNA polymerázy (RdRp). Je to enzym nezbytný pro syntézu nové virové RNA. Strukturálně je NS5B typická „pravouká“ polymeráza, s doménami prstů, dlaně a palce kompletně uzavírajícími aktivní místo⁹⁰. GDD motiv se nachází na „dlani“. Rychlost syntézy je mezi 150-200 nukleotidy za minutu a je nezávislá na koncentraci NS5B. Pro aktivitu RdRp je důležitá přítomnost iontů Mn^{2+} . Zn^{2+} ionty působí na RdRp naopak inhibičně⁹¹.

NS5B nekatalyzuje jen elongaci RNA (ať již autoiniciačním mechanismem copy back tedy zpětného kopírování RNA templátu nebo prodlužováním existujícího primeru), ale byla potvrzena i schopnost de novo primer nezávislé RNA syntézy při zvýšené koncentraci nukleotidů⁹².

C'koncová hydrofobní doména zajišťuje spojení s jadernou membránou, předpokládaným místem HCV replikace. Rovněž obsahuje determinanty pro interakci s NS5A. Deleční analýza potvrdila hydrofobičnost C'terminálních 21 AA. NS5B RdRp s C'terminální delecí je solubilní, zatímco RdRp s plnou délkou je lokalizována výhradně v perinukleární oblasti zakotvená k membráně. Tyto nálezy potvrzují hypotézu, že C'koncový úsek RdRp není esenciální pro vlastní polymerázovou aktivitu, ale hraje důležitou roli v replikačním cyklu in vivo. NS5B přímo interaguje s NS3 a NS4A, tyto proteiny tvoří dále komplexy s NS4B a NS5A. Popsané vzájemné interakce jsou důležité pro vznik a funkci replikačního komplexu.

NS5B nemá exonukleázovou ani proof-readingovou aktivitu, její přesnost je tudíž asi milionkrát menší, než u je tomu u DNA polymeráz prokaryotů či eukaryotů⁹³. Jako centrální hybatel HCV replikace je NS5B důležitým cílem pro přímo působící virostatika.

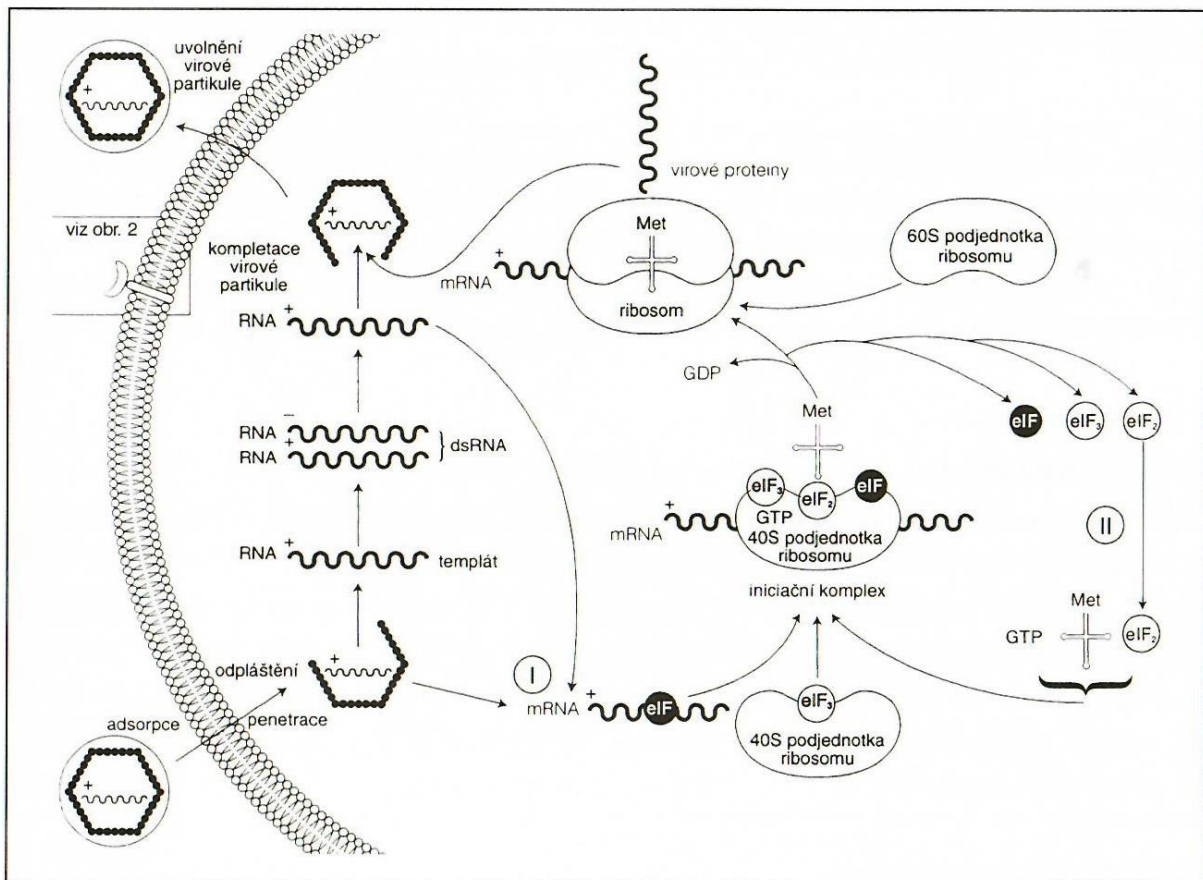
2.4. Replikační cyklus viru hepatitidy C

Prvním krokem je vstup HCV partikule do hostitelské buňky. Je to pomalý a komplexní proces, na kterém se podílí několik povrchových molekul hepatocytů včetně glykosaminoglykanů, CD81, scavenger receptoru třídy B (SR-BI) a manózu vázající lektiny DC-SIGN a L-SIGN^{94,95}. Iniciální kontakt viru a hostitelské buňky pravděpodobně podporují také lipoproteiny asociované s virionem. Po prvním přiblížení a kontaktu se obalový E2 protein váže s vysokou afinitou k externí kličce CD81. V posledních letech bylo identifikováno několik hostitelských molekul, které buňku chrání před HCV infekcí. Například EW1-2wint je protein schopný vazby k CD81, který dokáže zablokovat vstup HCV do buňky interakcí mezi virovými glykoproteiny a CD81^{96,97,98}.

Po vazbě virové částice k membránovému receptoru dojde k její penetraci do buňky. Nukleokapsida, která obsahuje pozitivně orientovanou jednovláknovou RNA, je následně uvolněna do cytoplazmy. Po odpláštění je virová genomová HCV RNA využita jak pro translaci (jako mRNA templát), tak pro transkripci negativního vlákna RNA a následnou replikaci. Jak již bylo zdůrazněno, translace HCV RNA není závislá na methylové čapce, ale je iniciovaná 5'koncovou strukturou HCV RNA lokalizovanou v 5'-NC regionu tzv. IRES. Překlad z mRNA do polyproteinu je zahájen vazbou IRES na ribozom v ER.

Z jednoho otevřeného čtecího rámce vzniká polyprotein, který je okamžitě štěpen jak buněčnými tak virovými proteázami za vzniku virových proteinů.

NS5B RNA-dependentní RNA polymeráza replikuje virovou RNA přes syntézu negativního RNA vlákna, to následně slouží jako templát pro syntézu nového pozitivního vlákna. Replikace a post-translační úpravy jsou v hostitelské buňce lokalizované v membránové síti, která se složena z virových nestructurálních proteinů a také z bílkovin hostitelské buňky. Tento útvar nazýváme replikačním komplexem a je lokalizován v blízkosti jaderné membrány. Opláštění nově syntetizované HCV RNA a vznik nukleokapsidy probíhá v ER a nukleokapsida následně získá svůj obal v Golgiho aparátu, těsně před tím, než jsou nové zralé virové partikule uvolněny z hostitelské buňky exocytózou^{99,100}. Replikační aktivita HCV je vysoká, denně vzniká až 10^{12} nových virionů, mají ale poločas jen několik hodin¹⁸. Virus hepatitidy C není sám o sobě cytopatický, k poškození hepatocytů dochází v důsledku imunitní reakce hostitele¹⁰¹. Nepřímým důkazem tohoto tvrzení je skutečnost, že elevace sérové ALT a AST korelující s nekrózou hepatocytů nastupuje až s časovým odstupem po dosažení vrcholu HCV virémie. Při podání glukokortikoidů nebo jiných imunopresiv u osob infikovaných HCV dochází k poklesu biochemických abnormalit a to i přes vzestup virémie. Stejný efekt byl pozorován u šimpanzů experimentálně infikovaných HCV^{18,101,102}. Poškození jaterního parenchymu při HCV infekci je způsobené prostřednictvím imunitní odpovědi hostitele. Přítomnost HCV v jaterních buňkách zahajuje kaskádu imunitních reakcí, která vede k destrukci hepatocytů prostřednictvím specifických cytotoxických (CD8+) T lymfocytů a NK buněk^{102,103}. Na koordinaci imunitních reakcí hostitele proti HCV se podílí rovněž cytokiny, mimo jiné IFN-gama, interleukin 2 a interleukin 12^{104,105}.



Obrázek 2 Schéma replikace flavivirů v infikované buňce (převzato z Řehák V. a L. Krekulová. Pegylované interferony – budoucí standard v léčbě chronických virových hepatitid. *Trendy v medicíně – zvláštní vydání*. 1998, 4, 1-20. ISSN: 1212-9046. Grafické zpracování Panax¹⁰⁶).

2.5. Genetická variabilita HCV

Pokud bychom chtěli virus HCV charakterizovat nejdůležitější vlastností, zdůraznili bychom jeho genetickou variabilitu. HCV genom je značně variabilní, jak již bylo zmíněno v popisu jednotlivých virových proteinů, frekvence výskytu mutací RNA není v rámci celého genomu stejná^{23,107,108}.

Některé oblasti jsou spíše konzervativní s minimální variabilitou – např. 5'-NC oblast, jiné jsou naopak hypervariabilní s dokumentovanými rozdíly i mezi jednotlivými virovými izoláty v rámci jednoho infikovaného hostitelského organismu. Vysoce variabilní jsou například dva úseky E2 kódující oblasti tzv. HVR 1 a HRV 2 (HVR = hypervariable region) nesoucí genetickou informaci pro 20 respektive 16 aminokyselin virového obalu. Právě vysoká proměnlivost tohoto antigenního lokusu je součástí virové strategie a ochranou před imunitním systémem hostitele^{18,109}.

Replikace HCV RNA probíhá pomocí RNA dependentní RNA polymerázy (RdRp), tedy enzymu, jehož replikační aktivita není příliš přesná⁹³. Četnost nukleotidových změn genomu HCV in vivo byla stanovena porovnáním sekvencí nukleotidů v NS5 a E1 regionech jednotlivých HCV izolátů, získaných od osob infikovaných ze společného zdroje¹¹⁰. Modelem pro tato sledování je epidemie v Irsku. V roce 1977 zde byla infikována skupina žen po aplikaci anti-D imunoglobulinu, který byl kontaminován HCV^{110,111}. Byla sledována četnost nukleotidových substitucí a frekvence tzv. němých mutací, tj. bodových mutací, které nevedou k záměnám na úrovni aminokyselin a k následným fenotypovým změnám. Sledování němých mutací je výhodnější pro sledování vývoje genomu HCV, protože mutující virové kmeny nejsou ovlivněny selekcí virových variant s odlišnými fenotypovými vlastnostmi v důsledku záměny aminokyselin¹⁸. Medián diference sekvencí nukleotidů na místech němých mutací v NS5 regionech jednotlivých izolátů byl mezi infikovanými příjemci anti-D imunoglobulinu 0,037, což odpovídá roční frekvenci substitucí 0,11 % na dané pozici. Je to téměř 3x více, než vypočítaná frekvence substitucí ve všech pozicích (0,041 % na pozici a rok). Srovnatelné výsledky byly zjištěny také pro E1 region (0,17 % němých a 0,073 % všech substitucí na daný lokus za rok)¹¹⁰.

Za předpokladu, že frekvence nukleotidových záměn je v čase konstantní, je četnost substitucí v NS5 a E1 regionech HCV genomu $1,4 - 2,0 \times 10^{-3}$ substitucí v daném lokusu za rok. Zjištěná četnost substitucí odpovídá očekávané frekvenci bodových mutací, odhadovaných na základě počtu chyb, kterých se dopouští RNA polymeráza a generační doby HCV při chronické infekci^{112,113}.

Klasifikace HCV genotypů

Jednotlivé genotypy zřejmě reprezentují varianty původního viru, které se začaly postupně odlišovat již před velmi dlouhou dobou. Minimální doba, která byla podle současných odhadů potřebná ke vzniku šesti rozdílných HCV genotypů je 1000–2000 let, pro subtypy se odhaduje asi 600 let^{112,113}.

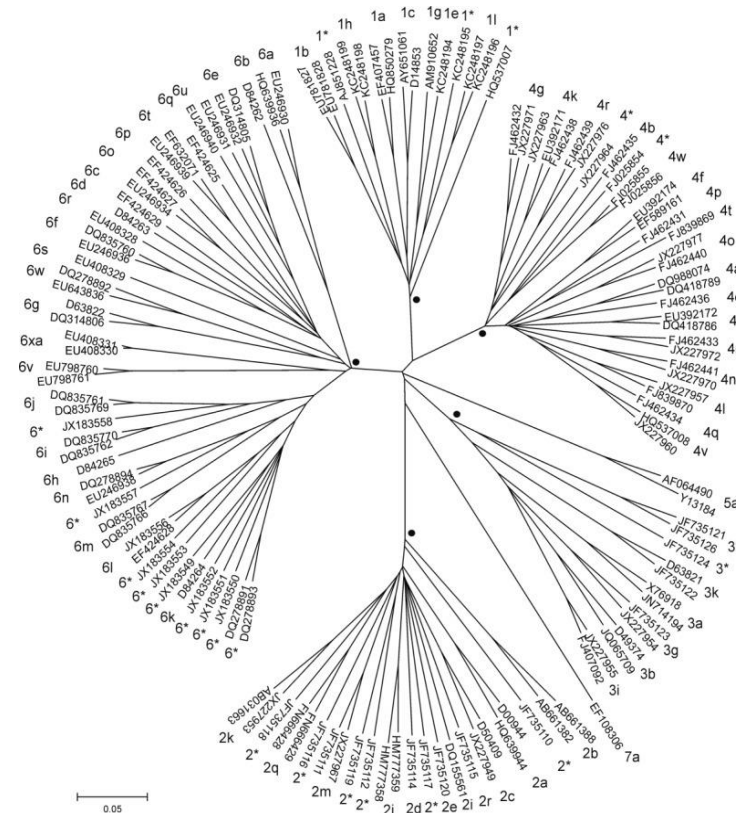
Existuje řada klasifikací popisujících odlišnost jednotlivých HCV izolátů. Různé klasifikační systémy využívají odlišné oblasti virového genomu (5'-NC, C, E1, NS5b)^{16,114,115,116,117}. S cílem sjednotit klasifikační systém HCV vzniklo v roce 1994 (2nd International Conference of HCV and Related Viruses) mezinárodně doporučené klasifikační schéma^{114,118}. Podle tohoto schématu jsou HCV izoláty rozlišeny na 6 genotypů a množství subtypů (obr. č. 3). Odlišnost mezi jednotlivými genotypy je v rámci celého genomu větší než 30 %, mezi subtypy 20 %. Dále jsou ještě popisované tzv. kvasispecies – kvazidruhy, kde je odlišnost v rámci celého genomu pod 10 %. Kvazidruhy se mohou vyskytovat i v rámci jednoho infikovaného subjektu. Čím delší je doba trvání HCV infekce u daného jedince, tím větší množství kvasispecies jsme schopni identifikovat a tím obtížnější je následná léčba daného pacienta. Genotypy jsou číslovány, subtypy jsou označovány malými písmeny a, b, c, ... v pořadí v jakém byly postupně objeveny, popsány a klasifikovány¹¹⁴.

Popisy a srovnávání nových sekvencí z doposud neprobádaných geografických oblastí vedly k poznatku, že existuje extrémně vysoký počet subtypů. Některé HCV varianty z Dálného Východu (Thajsko, Vietnam, Indonésie), které jsou řazeny ke genotypu 3 a 6, vykazují větší odlišnost, než je mezi subtypem a genotypem. Někteří autoři je proto klasifikují jako nové samostatné genotypy 7, 8, 9, 10 a 11¹¹⁹. Pro akceptování nového HCV genotypu musela být splněna následující konsenzuální kritéria¹²⁰:

1. musí být k dispozici minimálně 1 kompletní HCV sekvence kódující oblasti
2. musí být doložena existence minimálně tří epidemiologicky nezávislých izolátů
3. fylogenetická větev musí být odlišná od dříve popsanych sekvencí
4. musí být vyloučena intergenotypová nebo intersubtypová chiméra

Poslední upravená verze klasifikace HCV genotypů je z roku 2014 a přidala k původní klasifikaci jeden nový genotyp - číslo 7¹²¹. Na aktuálním seznamu GenBank (National Center for Biotechnology Information, NIH, USA) je tedy uvedeno 7 genotypů, 67 potvrzených a klasifikovaných subtypů a další subtypy, které na svoji finální klasifikaci ještě čekají. Stále předpokládáme, že se klasifikace HCV genotypů s ohledem na intenzivní výzkum a rostoucí množství nových registrovaných sekvencí bude pravděpodobně dále měnit. Poslední registrovaný genotyp 7a, který byl podnětem ke změně a aktualizaci klasifikačního systému, však nespĺňuje hned 2. bod konsenzuálního doporučení z roku 2005. Genotyp 7a dosud reprezentuje jen jeden izolát: QC69 EF108306. V novém rozšířeném klasifikačním systému však bylo 2. kritérium přehodnoceno. Nově stačí jen existence 1 unikátní sekvence kódující oblasti HCV genomu k ustanovení nového genotypu, při splnění zbývajících požadavků.

Rozšíření genotypů v různých oblastech je odlišné, souvisí pravděpodobně s dominantním způsobem šíření HCV infekce v jednotlivých populacích. Dominantní genotyp může odpovídat i době uvedení a rozšíření hepatitidy C v dané oblasti.



Obrázek 3 Fylogenetický strom 129 reprezentativních kompletních sekvencí kódujících oblastí HCV genomů. Konstruováno systémem MEGAS¹²² (převzato ze SMITH, D. B., J. BUKH, C. KUIKEN, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and

3. Přenos HCV infekce

Virové hepatitida typu C patří mezi parenterálně přenosné infekce. Pro akvizici je nutná expozice tělní tekutině nebo biologickému materiálu, který obsahuje virové partikule. Infekční materiál musí být v přímém kontaktu se sliznicí nebo tkáněmi po překonání kožní bariéry. To nastane třeba při poranění ostrým kontaminovaným předmětem, například při injekční aplikaci léků, návykových látek apod.

Mezi nejčastější cesty přenosu HCV infekce patří:

- injekční aplikace drog
- přenos krevními deriváty
- hemodialýza
- přenos orgánovým štěpem
- iatrogenní a nozokomiální přenos
- profesionální přenos
- tetování a piercing (při nedodržení aseptických podmínek, tedy prováděné neprofesionálně)
- vertikální přenos z matky na novorozence – perinatální přenos
- sexuální přenos (častější mezi muži, kteří mají nechráněný pohlavní styk (PS) s muži (MSM), při konfekcích s HIV či jinou pohlavně přenosnou chorobou)
- orientální invazivní techniky – akupunktura, baňkování, apod.

Přenos HCV transfuzními přípravky a krevními převody byl velmi častý před objevem viru hepatitidy C a zavedením testování dárců krve. Riziko akvizice HCV krevním převodem vypovídalo o stavu a promořenosti dané populace a významně se lišilo v různých zemích. V USA bylo před érou testování kolem 1,5 %, v Japonsku významně vyšší – až 8 %^{123,124,125,126}.

	New infections			Chronic infections			Deaths from cirrhosis and hepatocellular carcinoma		
	Total	Attributable to current injection drug use		Total	Among persons who currently inject (or recently injected) drugs		Total	Attributable to lifetime injection drug use	
	# (million)	# (million)	%	# (million)	# (million)	%	# (000s)	# (000s)	%
HBV	N/A	N/A	1.2	257	1.3	0.5	890	8.1	0.9
HCV	1.7	0.39	23.0	71	5.6	8	400	126.0	31.5

Tabulka 1 Zastoupení PWID (people who inject drug - osoby injekčně užívající drogy) v incidenci, prevalenci a počtu úmrtí na komplikace chronické HCV infekce (převzato z *Global Hepatitis Report, 2017*. Geneva: World Health Organization, 2017. ISBN 978-92-4-156545-5. Dostupné také z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf?sequence=1>⁹).

V České republice byla situace s přenosem HCV infekcí cestou krevních převodů a produktů relativně příznivá, vzhledem k nízké séroprevalenci v české populaci. Navíc bylo plošné testování antiHCV protilátek u potenciálních dárců krve zavedeno již v roce 1992, tedy necelé 3 roky po objevu HCV.

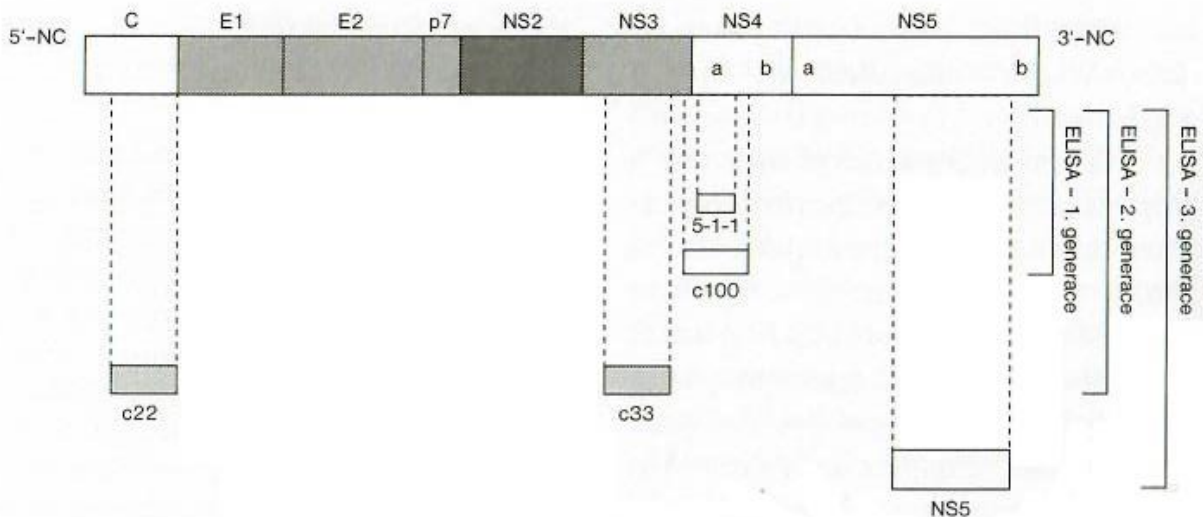
K bezpečnosti krevních převodů v ČR nepochybně přispívá i dlouhodobá praxe dobrovolného, tedy bezplatného dárcovství krve. V současné době je přenos HCV infekce krevními deriváty ve vyspělých zemích včetně ČR raritní. Bohužel v oblastech s nižší a nízkou úrovní zdravotní péče, je tato cesta přenosu stále možná. Ve vyspělých zemích je dominantním způsobem přenosu HCV již několik dekád injekční aplikace drog.

4. Diagnostika HCV infekce

Specifické rozpoznání HCV infekce je založené na laboratorních testech. Onemocnění zpravidla nemá jednoznačný klinický obraz, ani při fyzikálním vyšetření pacienta není většinou nález specifický pro tuto konkrétní diagnózu. Na HCV infekci je potřeba myslet již při odběru anamnézy, je nutné se zaměřit na epidemiologickou anamnézu a neopomenout dotazy cílené na rizikové chování.

Elevace tzv. jaterních testů, tedy enzymů obsažených v hepatocytech (AST a ALT) není pro diagnózu rozhodující. Stejně jako hodnota sérového bilirubinu nemusí být tyto základní biochemické parametry v patologických hodnotách a přesto může být pacient vysoce infekční.

Pro virovou hepatitidu C svědčí přítomnost protilátky antiHCV a průkaz virové RNA v séru nebo plazmě pacienta. Běžně dostupné je vyšetření antiHCV protilátek metodou ELISA (enzyme linked immunosorbent assays) či EIA (Enzyme Immunoassay) stanovující protilátku proti virovému antigenu. Protilátky jsou detekovatelné za několik týdnů po nákaze podle typu použitého testu. Test je tudíž negativní bezprostředně po nákaze a v časných fázích infekce HCV v době tzv. diagnostického okna.



Obrázek 4 ELISA metody k vyšetření antiHCV protilátek (převzato z KREKULOVÁ, Laura a Vratislav ŘEHÁK. *Virové hepatitidy: prevence, diagnostika a léčba*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4218-4³⁰).

Při nejasném sérologickém nález protilátek je vhodné použít konfirmačního testu (RIBA nebo PCR). Detekovatelná antiHCV protilátka nevypovídá o aktuálním stavu infekce u konkrétního jedince. Poskytuje pouze informaci, že daný organismus byl exponován HCV. Protilátka dlouhodobě přetrvává v séru hostitele i po eliminaci virové RNA, spontánní či terapeuticky navozené. Pozitivita antiHCV

protilátek je zpravidla první diagnostický krok. K ověření, zda je daný pacient aktuálně infekční a je indikován k dalšímu vyšetřování a k léčbě, potřebujeme vyšší úroveň testování.

Pro diagnózu akutní či chronické HCV infekce je tedy rozhodující přímý průkaz virové RNA v séru nebo plazmě pacienta. Nejčastější způsob testování HCV RNA je v současné době průkaz s využitím polymerázové řetězové reakce – PCR metoda. Koncentrace virové RNA se udává v IU/ml, dříve se používal počet kopií na ml. Kvantitativní stanovení HCV RNA by mělo být prováděno standardizovanou metodou s dolním limitem detekce <15 IU/ml.

Pomocí molekulárně genetických metod jsme též schopni určit jakým konkrétním HCV genotypem a subtypem je daný subjekt infikován. Genotypizovat můžeme také pomocí PCR technik, například s využitím genotyp-specifických primerů. V současné době je genotypizace zpravidla součástí diagnostického programu plně automatizovaných, uzavřených PCR amplifikačních systémů. PCR technikám a genotypizaci je věnována druhá část výzkumné práce, proto pro případné detaily k diagnostickým technikám odkazují na vlastní články na konci práce.

K určení pokročilosti jaterní infekce a poškození jaterního parenchymu používáme zobrazovací metody – ultrazvuk, CT, MR. V minulosti bylo zlatým standardem k ověření stavu jaterního parenchymu provedení jaterní biopsie.

Stanovení pokročilosti jaterní fibrózy je významným prognostickým ukazatelem. Ovlivňuje nejen rozhodnutí o terapii, ale též další péči o pacienta a jeho případné zařazení do screeningových programů portální hypertenze a hepatocelulárního karcinomu (HCC).

V současné době v klinické praxi jaterní biopsii nahradila elastografie jater. Měřením tuhosti jaterní tkáně poskytne informaci o stavu jaterního parenchymu, pokročilosti jaterní fibrózy, případně přítomnosti jaterní cirhózy. Nejrozšířenější je technologie VCTE (Vibration Controlled Transient Elastography). Další možností rozšířenou v klinické praxi jsou na ultrasonografii založené metody elastografie tzv. shear-wave elastografie (SWE). VCTE měří tuhost jaterního parenchymu v širokém rozsahu 2,5-75kPa. Pro jednotlivá jaterní onemocnění (HCV, HBV, ethylické poškození jater, nealkoholová steatohepatitida a další) existují horní limity naměřené tuhosti, korelující se stupněm fibrózy podle METAVIR skóre (F1-4)¹²⁷. Elastografická vyšetření jsou na rozdíl od jaterních biopsií neinvazivní, zcela nebolestivá a nemají žádná rizika komplikací. Lze je provádět též v terénu, tedy mimo zdravotnická zařízení a nemocnice, což vede ke zlepšení dostupnosti a ke zrychlení diagnostického procesu.

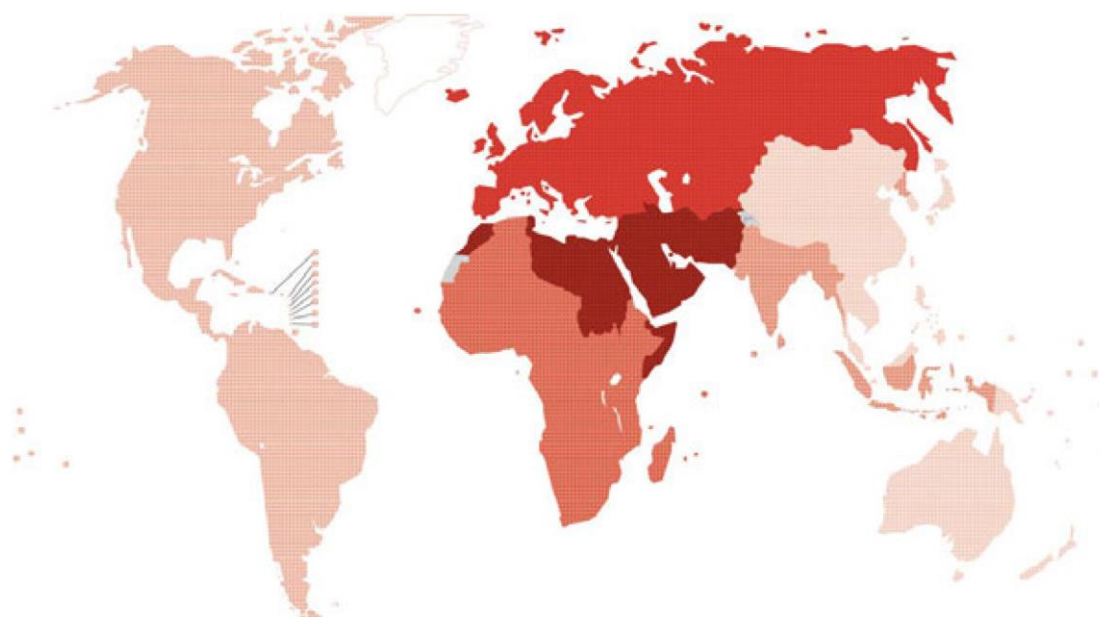
5. Výskyt virové hepatitidy C

5.1. Globální rozšíření virové hepatitidy C

Celosvětové rozšíření infekce virem hepatitidy C (HCV) již dávno dosáhlo měřítek pandemie^{8,9,128}. Podle nejnovějších odhadů WHO (World Health Organization – Světová zdravotnická organizace) z roku 2017 žije přibližně 1 % světové populace s HCV infekcí, v absolutních číslech je to kolem 71 milionů osob⁹. Odhady se významně liší od předposledního WHO reportu z roku 2013, kdy bylo dle tohoto zdroje infikováno 185 milionů lidí, z toho 130-150 miliónů lidí bylo ve stádiu chronické HCV^{7,129}. Nový odhad je v souladu s řadou studií, které sledují pokles incidence HCV od druhé poloviny 20. století^{130,131,132}.

Také poslední materiály EASLu (European Association for the Study of the Liver - Evropská asociace pro studium jater) z roku 2018 udávají 71 milionů viremických jedinců celosvětově¹⁰. V obou případech jde stále o násobek rozsahu pandemie HIV/AIDS¹¹.

Přepokládaná globální incidence HCV, odhadovaná matematickým modelováním byla 23,7 : 100 000, tedy 1,75 milionů nově infikovaných osob v roce 2015¹⁰. Počty nových případů HCV infekce se odhadují poměrně obtížně, neboť v případě HCV infekce hovoříme často o tzv. tiché nebo skryté epidemii. Vzhledem k naprosté převaze asymptomatických průběhů onemocnění v prvních letech až desetiletích od nákazy, je pravděpodobně větší část infikovaných osob dosud nevyšetřena a nedagnostikována⁶. Opožděná diagnóza vede nejen k dalšímu šíření nemoci, ale i k závažnějším zdravotním i socio-ekonomickým dopadům při řešení komplikací chronické HCV infekce jako je jaterní cirhóza, dekompenzovaná cirhóza nebo hepatocelulární karcinom (HCC).



Incidence of HCV infection					
WHO region	Map key	Incidence rate (per 100 000)		Total number (000)	
		Best estimate	Uncertainty interval	Best estimate	Uncertainty interval
African Region		31.0	22.5–54.4	309	222–544
Region of the Americas		6.4	5.9–7.0	63	59–69
Eastern Mediterranean Region		62.5	55.6–65.2	409	363–426
European Region		61.8	50.3–66.0	565	460–603
South-East Asia Region		14.8	12.5–26.9	287	243–524
Western Pacific Region		6.0	5.6–6.6	111	104–124
Global		23.7	21.3–28.7	1 751	1 572–2 120

Obrázek 5 Incidence HCV infekce v jednotlivých regionech dle WHO (převzato z *Global Hepatitis Report, 2017*. Geneva: World Health Organization, 2017. ISBN 978-92-4-156545-5. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf?sequence=1⁹)).

Pandemie HCV postihuje s různou prevalencí všechny WHO regiony (viz. obrázek 5). Nejvíce je zasažen Blízký východ (Eastern Mediterranean Region dle WHO) s incidencí 62,5: 100 000 obyvatel a také Evropa (European Region dle WHO klasifikace) s incidencí 61,8 na 100 000 obyvatel. Za většinou nových HCV infekcí ve vyspělých zemích stojí injekční aplikace drog mezi PWID (people who inject drug - osoby injekčně užívající drogy)^{8,12}. O závažnosti tohoto fenoménu svědčí též poslední studie z USA,

kde po mnoha desetiletích poklesu incidence, zaznamenali mezi lety 2010 a 2014 až dvojnásobný nárůst incidence HCV. Tento nárůst souvisí s rizikovým chováním PWID^{133,134,135}. Z celkového počtu 71 milionů infikovaných osob je asi 5,6 milionů (8 %) jedinců, kteří jsou aktivními PWID¹³⁶.

Pokročilá HCV infekce je každoročně zodpovědná za přibližně 670 000 úmrtí asociovaných s jaterním onemocněním¹³⁷ a předpokládá se, že toto číslo ještě poroste¹³⁸. Zpráva WHO z roku 2017 již odhaduje 1,34 milionů úmrtí asociovaných s chronickými virovými hepatitidami; 720 000 v souvislosti s fatálními komplikacemi jaterní cirhózy a 470 000 úmrtí na hepatocelulární karcinom⁹. Od roku 2000 se počty těchto úmrtí zvýšily o 22 %. Na rozdíl od mortality asociované s HIV/AIDS či tuberkulózou, mortalita asociovaná s virovými hepatitidami dosud nekulminovala.

Distribuce jednotlivých HCV genotypů má geografickou závislost, celosvětově jsou nejčtenější genotypy 1, 2 a 3^{139,140,141}. V Evropě jsou nejvíce zastoupeny subtypy 1a, 1b, 2a a 2b^{142,143,144,145}. V posledních letech se v evropských zemích, patrně v souvislosti se změnou hlavního způsobu šíření HCV infekce cestou injekční aplikace drog, zvyšuje i frekvence výskytu genotypu 3^{143,146,147,148}. Na Středním východě jsou nemocní nejčastěji nakaženi genotypem 4¹⁴⁹. Genotypy 5 a 6 se vyskytují v Jižní Africe a na Dálném Východě¹¹⁹. V Japonsku je nejčastější subtyp 1b, ve Spojených Státech jsou to subtypy 1a a 1b, s ohledem na intenzivní imigraci se zde postupně objevují i další genotypy^{148,150,151,152}.

Znalost genotypové distribuce v dané oblasti je důležitá pro sledování průběhu a šíření infekce ve sledované populaci a v čase. Významnou roli při změně genotypů může hrát změna hlavní cesty přenosu^{153,154}, případně příliv imigrantů do dané oblasti. Při odlišné citlivosti jednotlivých HCV genotypů na protivirovou terapii byla a do jisté míry ještě stále je znalost genotypu u konkrétního pacienta vodítkem při plánování léčebného postupu^{9,10}.

5.2. Rozšíření virové hepatitidy C v ČR

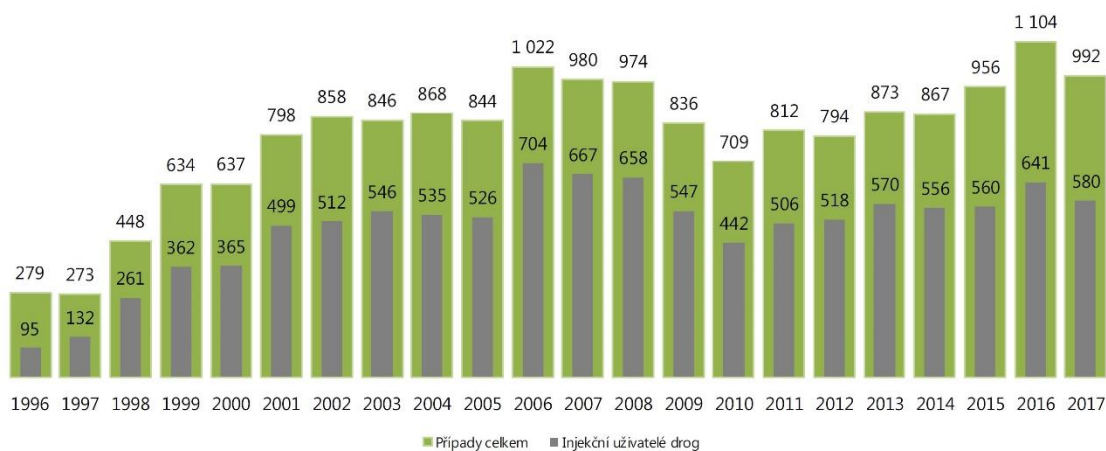
Popsat situaci v České republice je obtížné, zejména proto, že chybí aktualizovaná epidemiologická data. Opřít se můžeme pouze o jedinou reprezentativní séroprevalenční studii z roku 2001, o data Státního zdravotního ústavu (SZÚ, EpiDat do roku 2017, od roku 2018 ISIN - Informační systém infekčních nemocí), která meziročně udávají počty hlášených HCV infekcí a o studie mapující problémovou populaci PWID v ČR.

Česká republika patří mezi země s nízkou séroprevalencí HCV. Za příznivou situaci vděčíme velmi dobré úrovni zdravotnictví, používání jednorázových pomůcek a rychlému zavedení testování dárců krve na přítomnost antiHCV protilátek. Podstatnou roli mají též efektivní preventivní a výměnné programy v rámci péče o rizikově se chovající uživatele drog. Preventivní programy pro PWID v ČR byly zavedeny již začátkem 90. let minulého století, čímž zabránily a dosud účinně brání rozšíření HIV/AIDS ve skupině PWID a udržují relativně stabilní situaci s ohledem na šíření HCV infekce v této skupině.

Podle séroprevalenčního přehledu z roku 2001 byla séroprevalence v obecné populaci v České republice 0,2 %¹⁵⁵. Promořenost obecné, nerizikové populace je tedy velmi nízká¹⁵⁵. Díky diagnostice a dostupné léčbě HCV je aktuálně pravděpodobně ještě nižší a bude dále klesat. Pokles séroprevalence v obecné populaci přímo souvisí se způsoby přenosu HCV infekce.

Před objevem viru HCV a před zavedením screeningového vyšetřování dárců krve v roce 1992 se nákaza HCV v ČR šířila převážně iatrogeně^{156,157}. Po zavedení testování dárců krve a jednorázového injekčního materiálu ve zdravotnictví se hlavní cestou šíření HCV stala injekční aplikace návykových látek. V roce 1999 bylo takto infikováno minimálně 64 % osob s nově diagnostikovanou hepatitidou C

(viz graf 1). V České republice je situace o to zajímavější, že k masovému rozšíření zneužívání návykových látek došlo, ve srovnání s ostatními vyspělými státy relativně pozdě, až v 90. letech minulého století, v souvislosti s politickými změnami v ČR.



Graf 1 Hlášená incidence akutní a chronické HCV celkem a u injekčních uživatelů drog v letech 1996–2017 (převzato z MRAVČÍK, V., P. CHOMYNOVÁ, K. GROHMANNOVÁ, et al. *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog pro Evropské monitorovací středisko pro drogy a drogové závislosti: Česká republika*. Praha: Úřad vlády ČR, 2017. ISBN 978-80-7440-219-7¹⁵⁸).

Poslední publikovaná reprezentativní multicentrická séroprevalenční studie mezi PWID klienty nízkoprahových center z roku 2006 udává průměrnou séropozitivitu u PWID 34,97 % s významnou variabilitou v jednotlivých regionech¹⁵⁹.

V rizikově se chovající PWID populaci v Praze a ve středočeském kraji byla podle vlastních výsledků v letech 2010-2012 zjištěna séroprevalence 72 %¹⁶⁰. Zde se však nejedná o průřezovou studii, ale o prevalenci u pacientů doporučených do specializovaného hepatologického zařízení.

V roce 2018 realizovalo Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti (NMS) celorepublikovou studii *Séroprevalence VHC u injekčních uživatelů drog 2018* s cílem zjistit výskyt HCV infekce mezi aktivními PWID. Jednalo se o multicentrickou průřezovou dotazníkovou studii s testováním antiHCV protilátek. Testování proběhlo pomocí rychlých imunochemických testů z kapilární krve nebo ze slin. Studijní populaci tvořili aktivní PWID kontaktovaní v nízkoprahových centrech po celé ČR. K účasti ve studii byli vyzváni všichni PWID, kteří v době konání studie příslušná centra navštívili, jednalo se o tzv. exhaustivní výběr. Výsledná séroprevalence v popsané studii je 37,1 %, opět s významnými rozdíly v jednotlivých krajích ČR¹⁶¹.

Míra incidence HCV infekcí mezi PWID byla v ČR v minulé dekádě hlášena mezi 11 až 15 případy na 100 sledovaných osob a rok^{162, 163}.

Pro posouzení rozsahu epidemie HCV v ČR tedy musíme vycházet z odhadů velikosti rizikové populace PWID a kvalifikovaných odhadů rizikovosti jejího chování. Můžeme se opřít o výroční zprávy Národního monitorovacího centra, jehož poslední vydaná zpráva zahrnuje zpracovaná data z roku 2018¹⁶¹. Při odhadovaném počtu 43,7 tisíc PWID v ČR¹⁶⁴, séroprevalenci 34,97 %¹⁵⁹ a předpokládaném 70% přechodu HCV infekce do chronicity lze odhadnout 9,5-12 tisíc aktivních PWID s chronickou HCV infekcí¹⁶⁴.

5.3. Problematika užívání návykových látek v ČR

Užívání návykových látek v obecné populaci v ČR

Národní monitorovací centrum realizovalo v roce 2017 poslední dosud zpracované šetření „Prevalence užívání drog v populaci ČR“. Cílem bylo pomocí série otázek zjistit rozsah zkušeností s nelegálními drogami. Celkem bylo v rámci tohoto šetření osloveno 1507 respondentů ve věku 15 a více let, 1261 respondentů bylo ve věkovém rozmezí 15-64 let. Dotazovaní byli vybráni tzv. kvótním výběrem tak, aby reprezentovali populaci České republiky s ohledem na věk, pohlaví, vzdělání, kraj a velikost místa bydliště. Jako v předchozích šetřeních i v roce 2017 bylo kromě sledování tradičních nelegálních drog zjišťováno také užívání nových psychoaktivních látek.

Užití návykové látky někdy v životě uvedlo 31,2 % dotázaných ve věkové kategorii 15-64 let (38,4 % mužů a 23,8 % žen). Nejčastěji užitou nelegální drogou byly konopné látky 28,6 %, zkušenost s pervitinem uvedlo 3,3 % dotázaných, 1,1 % vyzkoušelo jiné opioidy (methadon, buprenorfin, fentanyl bez lékařského předpisu) a 0,2 % mělo zkušenost s heroinem. Nelegální drogy zkouší častěji muži. Výjimkou je užití psychoaktivních léků, což je jediná sledovaná kategorie, kde je větší zastoupení žen. Nejvíce respondentů se zkušeností s návykovou látkou je ve věkové skupině 25-34 let.

Podle posledního evropského průzkumu více než 92 milionů dospělých osob v EU, tedy více než čtvrtina jedinců ve věku 15-64 let vyzkoušelo nelegální drogy. Také v rámci EU převažují v experimentování muži nad ženami. Nejčastěji užitou drogou bylo konopí. Obdobný průzkum mezi studenty ve věku 15-16 let z 23 členských zemí EU a Norska zjistil, že v průměru 18 % studentů užilo konopí minimálně 1x v dosavadním životě (celoživotní prevalence). Největší míru celoživotní prevalence – 37 % hlásí Česká republika¹⁶⁵.

Problémové užívání návykových látek

Problémové užívání nelegálních drog bylo v Evropě tradičně definováno jako infekční a/nebo dlouhodobé a pravidelné užívání drog opiátového a/nebo amfetaminového a/nebo kokainového typu (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2009). Tato zastřešující definice byla v r. 2013 Evropským monitorovacím centrem pro drogy a drogové závislosti (EMCDDA) revidována a rozšířena o další drogy užívané s vysokou frekvencí (u konopí denně či téměř denně a u ostatních drog alespoň jednou týdně) nebo přinášející uživatelům zdravotní či sociální problémy (Thanki a Vicente, 2013). V ČR je tradičně jako problémové užívání drog (PUD) označováno injekční užívání jakékoliv drogy a/nebo dlouhodobé nebo pravidelné užívání pervitinu a opioidů (na rozdíl od definice EMCDDA tedy nikoli kokainu, konopných látek ani jiných drog). (Citováno z MRAVČÍK, V., P. CHOMYNOVÁ, K. GROHMANNOVÁ, et al. Výroční zpráva o stavu ve věcech drog pro Evropské monitorovací středisko pro drogy a drogové závislosti: Česká republika. Praha: Úřad vlády ČR, 2017. ISBN 978-80-7440-219-7¹⁵⁸).

Národní odhad počtu problémových uživatelů drog (PUD) je od roku 2002 prováděn každoročně za použití dat o počtu klientů nízkoprahových programů multiplikační metodou pro jednotlivé kraje a jejich součtem vzniká národní odhad. V roce 2017 bylo v ČR odhadnuto 47,8 tisíce problémových uživatelů pervitinu a opioidů (PUPO), z toho 34,7 tisíc uživatelů pervitinu a 13,1 tisíce uživatelů opioidů. Podle jednotlivých konkrétních látek bylo 6,9 tisíc uživatelů buprenorfinu, 3,9 tisíc uživatelů heroinu a 2,3 tisíce uživatelů jiných opioidů. Prevalence problémového užívání drog v ČR v roce 2017 dosáhla 0,69 % obyvatel ve věku 15-64 let, což odpovídá mírnému meziročnímu nárůstu¹⁵⁸. V horizontu posledních 4 let, je počet PUPO stabilní, již v roce 2013 přesáhl hranici 45 000. V roce 2017 bylo poprvé odhadnuto více než 13 000 (konkrétně 13 100) uživatelů opioidů. Tento nárůst může být významný, pokud se vzestupný trend potvrdí i v následujících letech.

Tradičně je v ČR velmi vysoký počet injekčně užívajících problémových uživatelů – v roce 2017 to bylo až 91,4 % - 43 700 osob. V roce 2013 přesáhl počet PWID hranici 40 000 a dál pomalu narůstá. Rovněž z dat NRLUD (Národního registru léčby uživatelů drog) vychází vysoké procentuální zastoupení injekčních uživatelů mezi žadateli o léčbu. V roce 2017 uvedlo injekční aplikaci 74 % uživatelů heroinu, 63 % uživatelů pervitinu a 51 % uživatelů buprenorfinu, který je určen výhradně k sublinguální aplikaci.

Zde je potřeba ještě jednou zdůraznit, že vysoké zastoupení injekčně aplikujících uživatelů je specifikem české drogové scény. V rámci EU se procento PWID mezi problémovými uživateli pohybuje kolem 35 %. Podle Evropské zprávy o drogách z roku 2018¹⁶⁵ je toto číslo odhadováno na základě odhadů prevalence injekčního užívání drog v jednotlivých členských zemích. Kvalifikované odhady od roku 2011 má však pouze 16 zemí. Injekční aplikace ve většině zemí je spojena s opioidy, stimulancia jako hlavní drogu udaly jen 4 země včetně České republiky.

V ČR je vysoké zastoupení PWID mezi problémovými uživateli dáno historicky díky velké popularitě budivých aminů a jejich nitrožilní aplikaci. Značná obliba pervitinu a jeho domácí výroba přetrvává i v současné době. Jak vyplývá z Výroční zprávy o stavu ve věcech drog v roce 2017, převládá výroba pervitinu v malých domácích výrobnách – varnách, s komunitním způsobem nejen výroby, ale i distribuce. V daném roce bylo odhaleno a zrušeno 264 varen. Většina varen byla s objemem výrobního cyklu kolem 50 g. Základním prekurzorem pro syntézu pervitinu je pseudoefedrin extrahovaný z léčiv. Na velkoobjemové výrobě a distribuci pervitinu participují nadále vietnamské organizované skupiny. Výroba se postupně přesouvá i mimo území ČR. V roce 2017 bylo v ČR zajištěno celkem 93,3 kg pervitinu o celkové čistotě 65 % a 19,1 kg heroinu o průměrné čistotě 23 %.

Můžeme ocenit kvalitu všech aktivních harm-reduction programů a zejména dosud relativně dobrou dostupnost výměnných programů, díky kterým se i přes vysoký podíl injekčních uživatelů v ČR podařilo udržet HIV/AIDS pod kontrolou s minimálním počtem infikovaných PWID. Na druhé straně je to právě vysoký podíl PWID na naší drogové scéně, který vede k reinfekcím HCV po terapiích.

Nejvíce problémových uživatelů drog je tradičně v Praze a dále v Ústeckém kraji – to jsou současně regiony s vysokým výskytem problémových uživatelů opioidů. Míra prevalence PUPO v ČR byla v roce 2017 6,91 na 1000 tisíc osob ve věku 15-64 let. Hodnotu nad uvedenou celostátní mírou prevalence vykazuje ještě Liberecký kraj.

Infekční komplikace spojené s injekčním užíváním návykových látek v ČR

V roce 2017 bylo 254 nově zachycených případů HIV infekce. Podíl přenosu HIV při injekčním užívání drog je v ČR dlouhodobě velmi nízký. V roce 2017 bylo nově zachyceno pouze 5 případů (2 %) nových infekcí HIV u mužů, u kterých došlo k přenosu infekce velmi pravděpodobně při injekční aplikaci drog. Dominantní cestou přenosu HIV v ČR je sexuální styk mezi muži (MSM) – 181 případů (71,8 %) nových infekcí v roce 2017, heterosexuální pohlavní styk vedl k 58 novým HIV infekcím¹⁵⁸.

V roce 2017 bylo v NRL pro AIDS provedeno 780 testů HIV osobám s anamnézou injekční aplikace drog. Všechny tyto testy (v roce 2017) byly negativní. Znepokojivý je ale dlouhodobý, kontinuální pokles prováděných testů HIV mezi PWID. V roce 1999 bylo testováno 2320 osob, od té doby počet testovaných PWID klesá od roku 2014 je již pod hranicí 1000 testů za rok.

Počty nově hlášených případů akutní virové hepatitidy typu B celkově i mezi PWID mají od roku 2000 klesající tendenci. Přispívá k tomu nepochybně zavedení povinného očkování v roce 2001. V roce 2017 bylo hlášeno celkem 85 nových případů virové hepatitidy typu B, z toho 14 (16,5 %) mezi PWID.

Podle údajů SZÚ je od roku 1998 více než polovina nových HCV infekcí zachycena mezi PWID. V roce 2017 bylo hlášeno 992 nových případů (akutní či chronické) HCV infekce, z toho bylo 580 mezi PWID

(58,5 %). Dlouhodobě roste průměrný věk nakažených PWID u nově hlášených případů HBV i HCV infekcí. Od roku 2014 jsou nově infikovaní PWID v obou případech v průměru starší 30 let.

V roce 2017 bylo hlášeno v ČR 772 nových případů virové hepatitidy typu A (VHA), z toho 10 u PWID (1,3 %). Výskyt VHA mezi PWID má meziročně kolísavý charakter. V roce 2008 byla zaznamenána epidemie s ohnisky v Praze a ve středních Čechách. Zpočátku docházelo k šíření VHA mezi PWID, následně tato infekce přeskočila i na obecnou populaci. Celkem bylo v roce 2008 hlášeno 228 případů VHA mezi PWID. Od roku 2008 pak počet případů mezi PWID klesal. Od srpna 2014 do července 2016 probíhala další epidemie akutní VHA, tentokrát v Karlovarském kraji a od roku 2015 pak probíhala epidemie v Libereckém a Jihomoravském kraji. V roce 2016 bylo 135 hlášených akutních HAV infekcí mezi PWID.

V roce 2017 bylo nahlášeno celkem 772 nových případů lues, z toho 44 případů diagnostikováno u PWID.

Od roku 2004 realizuje NMS každoročně průzkum mezi nízkoprahovými programy pro uživatele drog. Cílem průzkumu je získat informace o dostupnosti testování na infekční choroby, počty testů a testovaných a výsledky provedených testů. V roce 2018 se průzkumu účastnilo 64 nízkoprahových programů z ČR. Celkem 46 programů poskytlo výsledky testování na HIV, 51 programů dodalo výsledky testování na virovou hepatitidu typu C, 30 na VHB a 31 na syfilis. Evidovány jsou výsledky všech typů testů od rychlých imunochromatografických po laboratorní testování typu ELISA (enzyme linked immunosorbent assays) v krevním séru.

V nízkoprahových centrech v ČR bylo v roce 2018 testováno různými typy testů celkem 1414 rizikových klientů, z toho 227 (16,1 %) bylo testováno pozitivně na přítomnost antiHCV protilátky. V rámci monitoringu infekčních chorob cestou nízkoprahových zařízení nejde o reprezentativní vzorek uživatelů drog. Do programu se nezapojují všechny nízkoprahové programy. Uvedené výsledky pravděpodobně podhodnocují výskyt daných nemocí v populaci uživatelů drog.

Infekce	Testovaný ukazatel	Počet programů podle typu používaného testu			Osoby		
		Rychlý	Laboratorní	Celkem	Testováno celkem	Počet pozitivních	Podíl pozitivních (%)
HIV	anti-HIV	43	3	46	1 197	1	0,1
VHC	anti-HCV*	49	3	51	1 414	227	16,1
VHB	HBsAg**	24	3	27	722	8	1,1
	anti-HBc IgG***	3	3	6	116	0	0,0
Syfilis	anti-treponema pallidum*	29	3	31	712	3	0,4

Pozn.: * zařízení používá oba typy testů, ** antigen ukazující na akutní nebo chronickou aktivní infekci VHB,

*** anti-HBc IgG jsou protilátky vytvořené při akutní infekci VHB, ale přetrvávající dlouhodobě i po úzdavě.

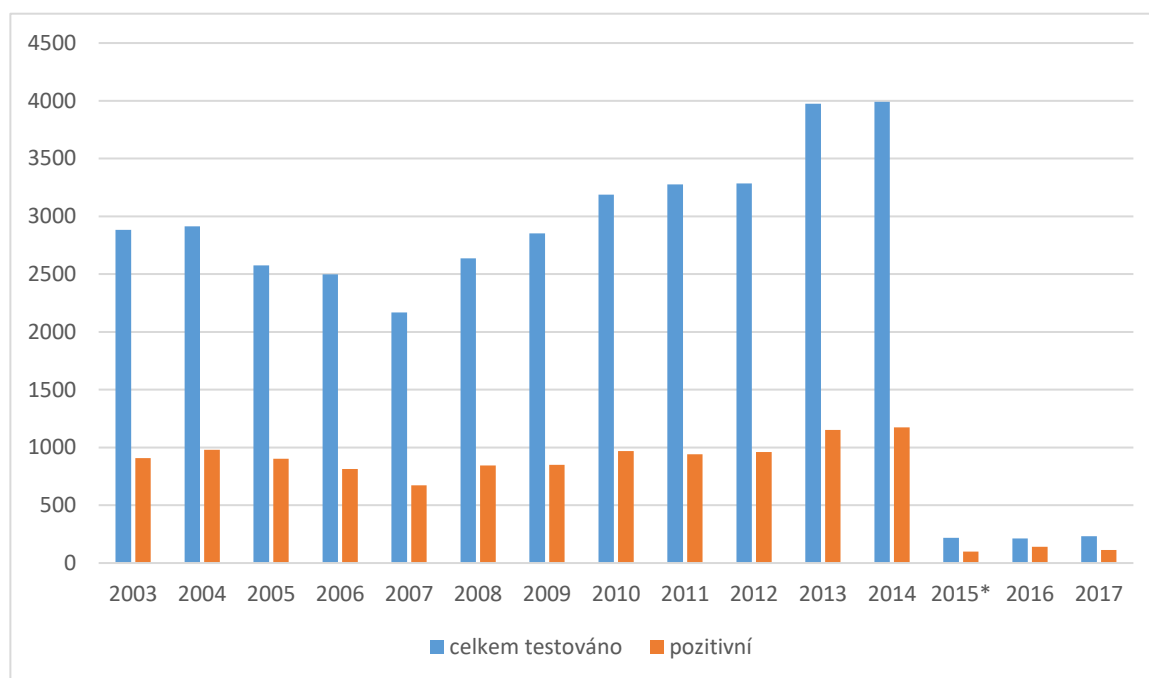
Tabulka 2 Přehled testování infekčních chorob v nízkoprahových centrech v ČR (převzato z MRAVČÍK, V., P. CHOMYNOVÁ, K. GROHMANNOVÁ, et al. *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2018*. Praha: Úřad vlády ČR, 2019. ISBN 978-80-7440-237-1¹⁶¹).

Další možností jak odhadovat prevalenci infekčních chorob mezi uživateli drog nabízí výsledky testování osob hlášených v Národním registru léčby uživatelů drog (NRLUD). NRLUD vznikl v roce 2015 sloučením substitučního registru (NRULISL) a Registru žádostí o léčbu. Sledovány jsou HAV, HBV, HCV a HIV infekce. V roce 2017 bylo v registru hlášeno 8647 léčených osob, z toho 3513 prvožadatelů.

Test na HIV byl proveden u 697 osob, ve 2 případech byl pozitivní.

Testování antiHCV protilátek bylo realizováno u 1272 osob, pozitivních bylo celkem 214 (séroprevalence 16,8 %), z nich bylo 63,6 % HCV RNA pozitivních. U injekčních uživatelů drog byla séroprevalence HCV 49,4 %, mezi klienty v substitučních programech byla očekávaně nejvyšší míra promořenosti se séroprevalencí 83,1 %.

Dlouhodobě byla séroprevalence HCV mezi injekčními uživateli v Registru žádostí o léčbu v letech 2003 – 2014 kolem 31 %, v roce 2015 došlo ke změně způsobu evidence – vysvětleno výše v textu, tedy data z let 2015-2017 jsou s předchozími obtížně srovnatelná a výsledná séroprevalence signifikantně vyšší.



Graf 2 Vývoj séroprevalence HCV mezi PWID (zpracováno podle: MRAVČÍK, V., P. CHOMYNOVÁ, K. GROHMANNOVÁ, et al. *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog pro Evropské monitorovací středisko pro drogy a drogové závislosti: Česká republika*. Praha: Úřad vlády ČR, 2017. ISBN 978-80-7440-219-7¹⁵⁸).

6. Virová hepatitida C – klinická manifestace

Klinický průběh virové hepatitidy C je interindividuálně značně odlišný^{18,136,166}. Předpokládáme, že více než 60 % infikovaných osob není schopno virus spontánně eliminovat a virová hepatitida C přechází do chronické fáze s variabilní závažností a rychlostí dalšího průběhu.

Inkubační doba virové hepatitidy C kolísá v rozmezí 15 až 160 dnů. Prodromální příznaky, jsou-li vůbec vyjádřeny a nemocným registrovány, jsou podobně jako u ostatních virových hepatitid zcela nespecifické. Může se vyskytnout zvýšená únava, malátnost, nevykonnost, bolesti kloubů (zejména drobných kloubů ruky), svalů a další málo specifické, chřipce podobné obtíže včetně subfebrilií. Přítomna může být také tlaková bolest v pravém podžebří, méně často gastrointestinální příznaky (nechutenství, nauzea a vomitus).

6.1. Akutní virová hepatitida C

Akutní infekce se vyznačuje vysokým počtem subklinických průběhů. Většina infikovaných je asymptomatická, jen malá část pacientů má symptomy odpovídající akutní fázi virové hepatitidy: únava, nauzea, zvracení apod. K rozvoji ikteru dochází u méně než 2 % symptomatických jedinců^{18,136}. Akutní hepatitida C je komplikována fulminantním průběhem jen zcela výjimečně. Celosvětově je popisováno méně než 0,1 % fulminantních průběhů. Diagnostika a záchyt akutních HCV infekcí je v klinické praxi spíše raritní. Je možný například při dlouhodobém sledování a pravidelném testování rizikově se chovajících jedinců (např. při pravidelném testování PWID v programech substituční léčby).

Nemáme k dispozici marker akutní infekce. O akutní HCV infekci tedy můžeme uvažovat v situaci, kdy detekujeme HCV RNA bez průkazu antiHCV protilátek u imunokompetentního pacienta. Další možností je dokumentovaná recentní sérokonverze u dispenzarizovaného pacienta.

Pravděpodobnost přechodu do chronicity je vysoká (60-80 %), neumíme předpovědět, u kterého pacienta dojde k úzdavě a u kterého se rozvine chronické onemocnění^{18,166}. Ikterický průběh, ženské pohlaví, mladý věk v době nákazy a polymorfizmy genu IL28B jsou faktory asociované se spontánní eliminací HCV.

Existuje souvislost mezi polymorfizmem genu IL28B a průběhem akutní fáze infekce. Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP single nucleotide polymorphism) v této oblasti byly objeveny, při hledání spolehlivého parametru predikce léčby pegylovanými interferony^{167,168}. Gen IL28B se nachází na 19. chromozómu a kóduje interferon lambda (IFN λ3). SNP jsou záměny jednotlivých nukleotidů na lokusech v blízkosti tohoto genu, které následně ovlivňují průběh infekce, případnou spontánní eliminaci HCV, rozvoj fibrózy i odpověď na terapii. Nejsilnější předpovědní hodnotu vykazuje analýza lokusu rs12979860, kde existují varianty tvořené alelami C nebo T – tedy CC, CT nebo TT. Ikterická forma akutní HCV byla častější mezi nemocnými s CC genotypem v porovnání s pacienty s CT nebo TT genotypem. U pacientů se symptomy v akutní fázi, s ikterickým průběhem a CC genotypem, docházelo též významně častěji ke spontánní eliminaci viru po akutní infekci^{169 170 ,171}. Jak již bylo zmíněno, polymorfizmus IL28B byl jedním z predikčních faktorů odpovědi na terapii interferonem. Nejpriznivější variantou spojenou s dosažením setrvalé léčebné odpovědi (SVR) je alela CC, naopak pacienti nesoucí alely TT měli nejmenší pravděpodobnost dosáhnout virologické odpovědi navozené interferonem.

6.2. Chronická virová hepatitida C

Jako chronicky nemocného označíme pacienta, který má detekovatelnou antiHCV protilátku a HCV RNA po dobu minimálně šesti měsíců. Spontánní virová clearance po šesti měsících od nákazy je možná, ale její pravděpodobnost s délkou trvání infekce významně klesá¹⁸.

Většina pacientů nemá v počátečních fázích chronického onemocnění žádné příznaky a obtíže. Diagnostika je obtížná vzhledem k obvykle asymptomatickému průběhu. Nikoliv výjimečně je virová hepatitida C zjištěna náhodně v rámci preventivních či předoperačních vyšetření u zcela bezpříznakových osob. Také průběh chronické infekce je individuálně velmi odlišný. Základní, dříve pravidelně sledované biochemické parametry, například hodnota ALT, nejsou objektivním ukazatelem závažnosti onemocnění a nekorelují s mírou postižení jaterního parenchymu. Kolem 30–40 % chronicky nemocných má hodnoty sérových aminotransferáz v mezích normy. Pacienti s dlouhodobě normální aktivitou ALT v séru mohou mít histologicky závažný nález²².

Míra postižení jaterní tkáně u jednotlivých pacientů je značně variabilní: od mírné hepatální léze, prakticky bez vývoje, po aktivní zánět s výraznou fibrotizací a progresí do cirhózy. Závažný průběh s přechodem do cirhózy je popisován asi u 20 % nemocných s chronickou HCV infekcí. Průběh onemocnění a rozvoj uvedených následků je obvykle pomalý v intervalu 15–30 let. U některých jedinců však může destrukce jaterního parenchymu postupovat mnohem rychleji. Mezi nemocnými s rozvinutou cirhózou je frekvence výskytu hepatocelulárního karcinomu 2–5 % ročně. Infekce HCV je přítomna u přibližně 40 % nemocných s jaterní cirhózou ve stadiu dekompenzace a u 60 % pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Následky chronické HCV infekce jsou nejčastějším důvodem transplantace jater, v této indikaci je prováděno více než 30 % všech výkonů¹⁷².

Kromě známých a všeobecně uznávaných faktorů, spojených s progresí onemocnění (věk v době nákazy, délka trvání infekce, pohlaví, současná konzumace alkoholu a koinfekce virem hepatitidy B či HIV), je průběh HCV infekce ovlivněn také virovým genotypem^{173,174}. Klinické studie, zaměřené na tuto problematiku prokázaly větší pravděpodobnost rozvoje chronického onemocnění v souvislosti se subtypem 1b^{150,174,175,176,177,178}. Po akutní expozici HCV 1b došlo k rozvoji chronické infekce u 92 % nakažených jedinců, jednalo-li se o jiný genotyp, byl přechod do chronicity pouze 33–50 %²². Subtyp 1b je podle některých prací spojován s větším rizikem rozvoje jaterní cirhózy a hepatocelulárního karcinomu^{172,179}. Tento subtyp je v současné době nejčastější mezi nemocnými, jejichž stav vyžaduje transplantaci jater^{152,174,179}.

6.3. Extrahepatální projevy HCV infekce

Chronická HCV infekce může u některých pacientů manifestovat extrahepatálně. Již delší dobu je popsána souvislost HCV infekce a systémového autoimunitního nebo imunokomplexového postižení.

<p>Silná vazba, předpokládaná přímá role HCV</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kryoglobulinémie - Membranoproliferativní glomerulonefritis - B-lymfocytární non-Hodgkinské lymfomy - Vaskulitidy
<p>Předpokládaná vazba, patogenní role HCV není plně objasněna</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sjögrenův syndrom - Autoimunitní onemocnění štítné žlázy - Papilární karcinom štítné žlázy - Porucha glukozové tolerance – diabetes mellitus II. typu
<p>Možná vazba na VHC, patogenní role HCV infekce doposud neprokázána</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lichen planus - Porfyria cutanea tarda - Polyarteritis nodosa - Revmatoidní artritida - Ulcerace rohovky - Periferní neuropatie

Tabulka 3 Extrahepatální projevy a systémová postižení související s infekcí HCV (upraveno podle KREKULOVÁ, Laura a Vratislav ŘEHÁK. *Virové hepatitidy: prevence, diagnostika a léčba*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4218-4³⁰).

Jejich patogeneze má více mechanismů (tvorba autoprotilátek, paraproteinů při proliferaci B- buněk nebo ukládání imunokomplexů). Typickým příkladem je systémová vaskulitida s multiorgánovým postižením při smíšené kryoglobulinémii. Nepochybná je i asociace HCV infekce s B-buněčným non-Hodgkinským lymfomem (B-NHL). Nemocní s chronickou HCV infekcí mají často detekovatelné autoprotilátky. Většinou jsou jen v nízkých titrech a nejsou klinicky signifikantní. Klinicky manifestní extrahepatální postižení je jednou z indikací k neodkladné léčbě bezinterferonovými režimy^{180,181}. Nejčastější extrahepatální projevy a systémová postižení související s HCV infekcí shrnuje tabulka 3.

7. Léčba HCV infekce

Podstatou léčby je eliminovat virus z hostitelského organismu. Vyléčení HCV infekce vede, podle stavu jaterního parenchymu před zahájením léčby, k prevenci nebo ke snížení rizika rozvoje jaterních i mimojaterních komplikací. Vyléčením pacientů s již pokročilou jaterní fibrózou či cirhózou významně snižujeme jejich rizika dekompenzace cirhózy a rozvoje HCC. Úzdrava zvyšuje kvalitu života pacienta. Léčba je též účinná prevence dalšího šíření viru.

Neumíme spolehlivě předpovědět, u kterých pacientů bude mít onemocnění pomalou, středně rychlou nebo rychlou progresi a u kterého nemocného dojde k rozvoji závažných následků chronické HCV infekce. Proto se snažíme léčit nemocné s virovou hepatitidou C časně, před rozvojem následků infekce.

V ČR jsou k léčbě indikováni všichni pacienti s chronickou HCV infekcí, kteří se léčit chtějí a nemají kontraindikace. Jde o pacienty dosud neléčené (naivní) i pacienty v minulosti neúspěšně léčené. Terapii je vhodné bezodkladně zahájit zejména u jedinců s pokročilou fibrózou nebo kompenzovanou jaterní cirhózou, u nemocných s extrahepatálními projevy, s rekurencí pro transplantaci jater a s koinfekcí s HBV či HIV. Dále je potřeba léčit pacienty představující epidemiologické riziko: PWID, MSM, pacienty v dialyzačních programech a ženy plánující graviditu. Pacienti s dekompenzovanou cirhózou by měli podstoupit transplantaci jater a až následně virostatickou léčbu, protože tento postup zlepšuje jejich prognózu. K léčbě nejsou indikováni pacienti, jejichž přežití je limitováno jiným onemocněním¹⁸⁰.

Léčba HCV infekce byla od identifikace etiologického agens až do roku 2010 založena na podávání interferonu. Měla řadu vedlejších účinků, kontraindikací, byla dlouhá a často nevedla k uzdravě. První generace přímo působících virostatik (proteázových inhibitorů PI) se přidávala do kombinace k interferonovým režimům a zvyšovala účinnost terapie. Trojkombinační léčba byla nemocnými snášena ještě hůř než předchozí režimy, protože první generace PI měla navíc ještě svoje specifické nežádoucí účinky. Až v posledních několika letech využíváme bezinterferonové léčebné kombinace, které jsou nejen velmi účinné, ale také bez nežádoucích efektů.

Zavedením nových léčiv se změnila indikační kritéria, ubylo kontraindikací léčby a zjednodušilo se monitorování efektu léčby v jejím průběhu a po vysazení. Éra interferonů je definitivně u konce. V dalším textu ji ale nelze opomenout, přestože bude opakovaně připomínáno, že v současné době jsou některé postupy a kritéria již překonány a nepoužívají se.

7.1. Cíle léčby a historické rozdělení léčebné odpovědi

Primárním cílem léčby chronické HCV infekce je dlouhodobá eliminace viru z organismu pacienta, tj. dosažení setrvalé virologické odpovědi na léčbu (SVR).

Odpověď na protitivirovou léčbu byla historicky (v éře interferonů) charakterizována jako:

1. Virologická odpověď - nedetekovatelná virémie (při stanovování metodou real time PCR odpovídá negativní nález hodnotám <15 IU/ml). Virologická odpověď je dlouhodobě považována za jediné směrodatné kritérium úspěšnosti léčby.

2. Biochemická odpověď - normalizace sérové alaninaminotransferázy (ALT). Význam izolované biochemické odpovědi byl v minulosti přeceňován, v éře DAA již toto kritérium není relevantní.

3. Histologická odpověď - zlepšení nálezu při kontrolní jaterní biopsii (zlepšení o ≥ 2 Knodell HAI bodů) respektive nálezu kontrolní elastografie po léčbě.

Průběh léčby byl kontinuálně sledován a hodnocen, vzhledem k délce léčby interferony a častým vedlejším účinkům, byly kontroly zpočátku po 4 týdnech, v pozdějších fázích se intervaly mohly při dobré toleranci prodloužit. Po farmakoterapii následovalo období sledování po léčbě, které původně trvalo 24 týdnů.

V éře interferonů byly prognosticky významné následující mezníky:

Velmi časná/rapidní virologická odpověď (rapid virological response, RVR)- negativní PCR HCV po 4 týdnech léčby a normalizace hodnot ALT. Nemocní, u nichž nedošlo k RVR, měli výrazně nižší pravděpodobnost trvalého vyléčení.

Časná virologická odpověď (early virological response, EVR) byla zásadním mezníkem při léčbě interferony. Jednalo se o stanovení HCV RNA ve 12. týdnu léčby, kdy dle doporučení měl být pacient již bez detekovatelné virémie. Pozitivní PCR nález v tomto týdnu byl indikací k ukončení terapie. V některých případech bylo v léčbě pokračováno, neboť před érou DAA nebyla pro pacienta jiná efektivnější alternativa a pacienti se vysazení terapie často bránili. S ohledem na špatnou prognózu léčby při nedosažení EVR a vysoké riziko relapsu po ukončení farmakoterapie se léčba, ve snaze po dosažení SVR někdy ještě prodlužovala.

Odpověď na konci léčby (end of treatment response, ETR) - virologická a biochemická odpověď při ukončení léčebného schématu.

Setrvalá virologická odpověď (sustained virological response, SVR) - kompletní biochemická a hlavně virologická odpověď, která přetrvává 24 a více týdnů po ukončení léčby. Při dosažení SVR je virus z hostitelského organismu eliminován. Původní práce stanovovaly SVR až 24 týdnů po dokončení farmakoterapie. Následně bylo prokázáno, že pravděpodobnost virologického relapsu mezi 12. a 24. týdnem sledování po farmakoterapii je velmi malá a proto novější práce označují za SVR již nedetekovatelnou virémii HCV RNA ve 12. týdnu sledování po léčbě¹⁸².

Zavedením DAA režimů do léčby, se doba léčby podstatně zkrátila a zjednodušilo se její monitorování.

Mezinárodní doporučené postupy nestanovují fixní intervaly klinických kontrol ani průběžné monitorování virologické odpovědi. Obecně je doporučeno monitorovat bezpečnost léčby a lékové interakce při léčbě. Jako jediné obecně uznávané měřítko úspěšnosti zůstalo stanovení SVR 12 týdnů po léčbě.

Pokud dokumentujeme dosažení SVR, je následné riziko relapsu onemocnění minimální a při novém průkazu HCV RNA, je vysoce pravděpodobné, že došlo k reinfekci. K reinfekcím dochází zpravidla u rizikově se chovajících jedinců (PWID, MSM, vězni, pacienti s duální infekcí). K reinfekci může dojít jak po úspěšné léčbě s dosažením SVR, tak po spontánní virové eliminaci (u pacienta v minulosti virologicky negativního s antiHCV séropozitivitou). Diagnózu reinfekce může podpořit i průkaz jiného genotypu či subtypu HCV než při původní infekci.

Je-li dosaženo SVR a pacient se dále nechová rizikově a není-li HCV infekci znovu exponován, je virová clearance dlouhodobá a je spojená s nedetekovatelnou hladinou viru nejen v krevním séru, ale i v jaterním parenchymu^{183,184}.

U necirhotického pacienta, který dosáhne SVR a nechová se rizikově, považujeme HCV infekci za vyléčenou, bez nutnosti dalšího dlouhodobého sledování. Pacienti s cirhózou nebo vyšším stupněm jaterní fibrózy (Metavir F3) jsou po dosažení SVR zařazeni do dispenzárních programů HCC a portální hypertenze¹⁸⁰.

Po terapii s dosažením SVR dochází k postupné regresi jaterní fibrózy, ve většině případů i cirhózy. Bývá to doprovázeno zlepšením klinického stavu, prodloužením předpokládaného dožití a snížením pravděpodobnosti rozvoje pozdních komplikací jako je HCC^{185,186}.

Kromě pacientů, kteří na léčbu odpověděli eliminací HCV infekce, jsou i jedinci, kteří na léčbu nezareagovali. V době interferonových režimů nebyli výjimkou tzv. nonrespondeři, u nichž byla po celou dobu léčby detekovatelná virová HCV RNA a léčba se většinou předčasně ukončovala.

Virologický relaps během léčby (tzv. breakthrough fenomén) nebo po léčbě je další příčinou selhání terapie. Po iniciálním dosažení virologické odpovědi je ještě během léčby nebo po jejím vysazení opět detekována HCV RNA. Důvodem breakthrough fenoménu byl v éře IFN pokles nebo ztráta účinnosti interferonu. Jeden z možných mechanismů byl vznik protilátek proti IFN a jeho neutralizace hostitelským organismem.

7.2. Vývoj a historie léčby virové hepatitidy C – éra interferonů

Na poli specifické virostatické terapie je nejvíce patrný intenzivní virologický výzkum HCV v předešlých dekádách. Léčba HCV infekce zažila v posledních letech bez nadsázky revoluci. Úspěšnost léčby novými virostatiky, jejich dobrá snášenlivost a minimum nežádoucích účinků opravňuje k optimismu v oblasti plánované celosvětové eradikace HCV infekce.

Historie léčby chronických virových hepatitid se se datuje do počátku 70. let minulého století. První sdělení o úspěšném použití interferonu v léčbě chronické virové hepatitidy B (VHB) publikoval již Greenberg v roce 1976¹⁸⁷. O deset let později popsal efekt interferonu u chronické nonA nonB hepatitidy Hoofnagle¹⁸⁸. Bylo to 2 roky před objevem etiologického agens – viru hepatitidy C¹.

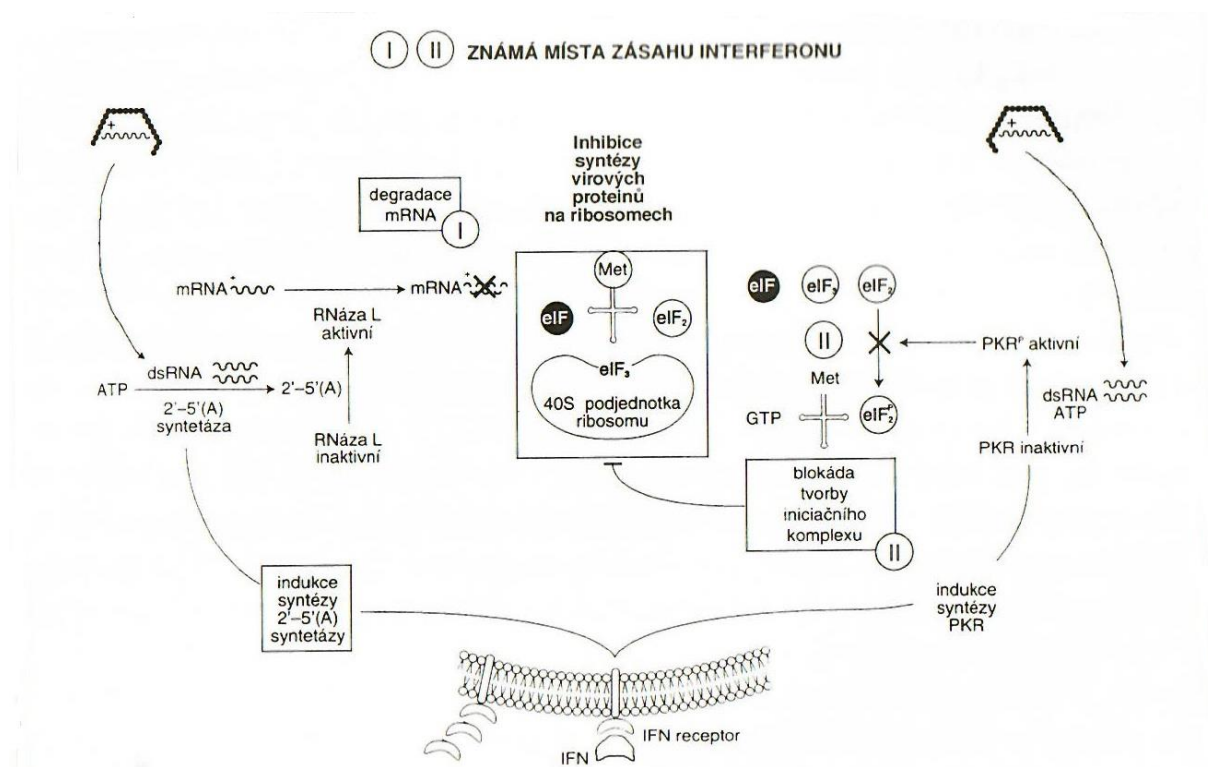
Mechanismus účinků interferonů

Účinky interferonů jsou velmi pestré, jejich efekt v případě infekce viry hepatitid je jak imunomodulační, tak protivirový. Velká část imunitně aktivních buněk nese receptory pro interferon, který je tak schopen indukovat kaskádu imunitních reakcí. Prostřednictvím interferonů dochází k aktivaci monocytů, makrofágů, NK buněk a cytotoxických T lymfocytů¹⁸⁹. Interferony zvyšují expresi molekul HLA třídy I a II na povrchu buněk a zvyšují produkci dalších cytokinů imunitně aktivními buňkami.

Virová infekce buňky vede k produkci interferonu α a β , který aktivuje protivirové mechanismy dosud neinfikovaných buněk v okolí a zabrání tak dalšímu šíření infekce

Všechny tři typy interferonů skupiny I se váží na jediný receptor, který je exprimován na povrchu téměř všech buněk. Po vazbě na receptor cílové buňky dochází k expresi více než 30 genových produktů. Mezi nejdůležitější proteiny s přímou protivirovou aktivitou patří 67kDa proteinkináza, která inhibuje fosforylaci eIF-2 (podjednotka translačního iniciačního faktoru eukaryotických buněk) a tím blokuje translaci proteinů.

Dalším důležitým enzymem s protivirovou aktivitou, který je interferonem aktivován je 2',5'-oligoadenylátsyntetáza. Ta následně aktivuje endoribonukleázu (RNáza-L), která štěpí jednovláknovou mediátorovou RNA (mRNA) a blokuje tím další virovou replikaci¹⁹⁰. Mechanismus účinku interferonů při replikaci flavivirů v infikovaných hepatocytech je zjednodušeně znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6 Interferonem navozená inhibice syntézy virových proteinů u flavivirů (IFN-interferon;PKR-proteinkináza aktivovaná pomocí RNA (zvaná též P68 kináza,P1,DA1,ds1 nebo eIF2 kináza); eIF2,3,4-podjednotky translačního iniciačního faktoru eukaryotických buněk; dsRNA-dvouvláknová ribonukleová kyselina; mRNA-mediátorová ribonukleová kyselina; ATP,ADP-adenosintrifostát, adenosindifostát; GTP,GDP-guanosintrifostát, guanosindifostát; Met-methionin; tRNA-transferová ribonukleová kyselina). (převzato z Řehák V. a L. Krekulová. Pegylované interferony – budoucí standard v léčbě chronických virových hepatitid. *Trendy v medicíně – zvláštní vydání*. 1998, 4,1-20 . ISSN: 1212-9046. Grafické zpracování Panax¹⁰⁶).

Monoterapie interferonem

K léčbě hepatitid se využívaly tzv. rekombinantní interferony vyráběné bez použití substancí humánního původu, heterologně produkované v buňkách bakterie *E. coli*. Přírodní interferony byly dle konvence označovány písmeny řecké abecedy. Interferony produkované rekombinantní technologií byly označovány slovně – alfa, beta,... Běžně dostupné a v ČR nejvíce využívané byly IFN alfa-2a a IFN alfa-2b, které se lišily v jedné aminokyselině. Interferon byl k dispozici pouze v injekční formě k subkutánní aplikaci 3x týdně nebo ob den po dobu 6-18 měsíců. Úspěšnost monoterapie IFN byla pouze 10-20 % . Výsledky řady klinických studií prokázaly, že HCV genotyp 1, zejména subtyp 1b, byl spojen s horší odpovědí na léčbu interferonem alfa^{22,174,175,176,178,191}.

Dvojkombinace interferonu s ribavirinem

Interferon alfa (rekombinantní či lymfoblastoidní) byl k léčbě chronické hepatitidy C používán nejprve v monoterapii později pak v kombinaci s ribavirinem. Oba léky byly v této indikaci používány také v ČR^{156,157,192}.

Imunomodulační a virostatický efekt interferonu je potencován nukleosidovým analogem ribavirinem. Protivirový efekt ribavirinu má pravděpodobně více mechanismů. Byla popsána kompetitivní inhibice dehydrogenázy inosin monofosfátu (IMPDH), tedy enzymu nezbytného k syntéze guaninových nukleotidů. Jeho inhibice vede následně k depleci guanidintrifosfátu (GTP) a k zástavě virové replikace. Tento mechanismus je považován za hlavní virostatický efekt ribavirinu při léčbě HCV infekce. Dále byla popsána také inhibice virové polymerázy (ale pouze u viru chřipky, nikoliv u HCV), alterace guanylace a vytvoření vazebného místa na 5' konci mRNA, které je nezbytné pro vazbu k ribozomům. Ribavirin též mění poměr Th1 a Th2 lymfocytů a tím potencuje svůj virostatický efekt¹⁹³. Denní dávka ribavirinu byla určena podle tělesné hmotnosti pacienta a HCV genotypu, kterým byl infikován. Podával se ve všech následujících kombinacích vždy 2x denně. Účinnost léčby se podstatně zvýšila, SVR dosáhlo více než 40 % léčených pacientů.

Zpočátku byla kombinovaná léčba (interferon + ribavirin) ordinována pouze nemocným po neúspěšné monoterapii interferonem alfa. Po zveřejnění dvou registračních studií v roce 1998 se stala dvojkombinační léčba standardem i pro dosud neléčené pacienty^{191,194}.

Pegylované interferony

Dalším stupněm ve vývoji účinnější léčby chronických virových hepatitid byly tzv. pegylované interferony (PEG-INF). Pegylace je technologie sloužící k modifikaci farmakokinetických vlastností proteinů využívaných k léčbě. U proteinů, zejména s krátkým poločasem dochází in vivo k rychlé degradaci a eliminaci. Polyetylénglykol (PEG) je ve vodě rozpustný, netoxický polymer, který je charakterizován délkou svého řetězce, větvením (lineární nebo rozvětvený) a dále lokalizací, počtem a typem vazeb s příslušným proteinem. Pegylací proteinů je dosaženo vyšší rozpustnosti, snížení rychlosti proteolýzy, snížení imunogenicity, snížení renální eliminace, zvýšení poločasu cirkulace v plazmě a změn v distribuci a absorpci. Pegylací interferonu bylo dosaženo podstatně delšího poločasu eliminace při zachování jeho biologických vlastností. To umožnilo podávání takto modifikovaného interferonu pouze 1x týdně. Subkutánní podání jednou týdně v porovnání s aplikací 3x týdně nebo ob den zvýšilo komfort, respektive mírně snížilo dyskomfort pacientů při terapii. Současně bylo díky pegylaci dosaženo rovnoměrnější absorpce a tím též zmírnění nežádoucích vedlejších účinků tohoto léku¹⁹⁵.

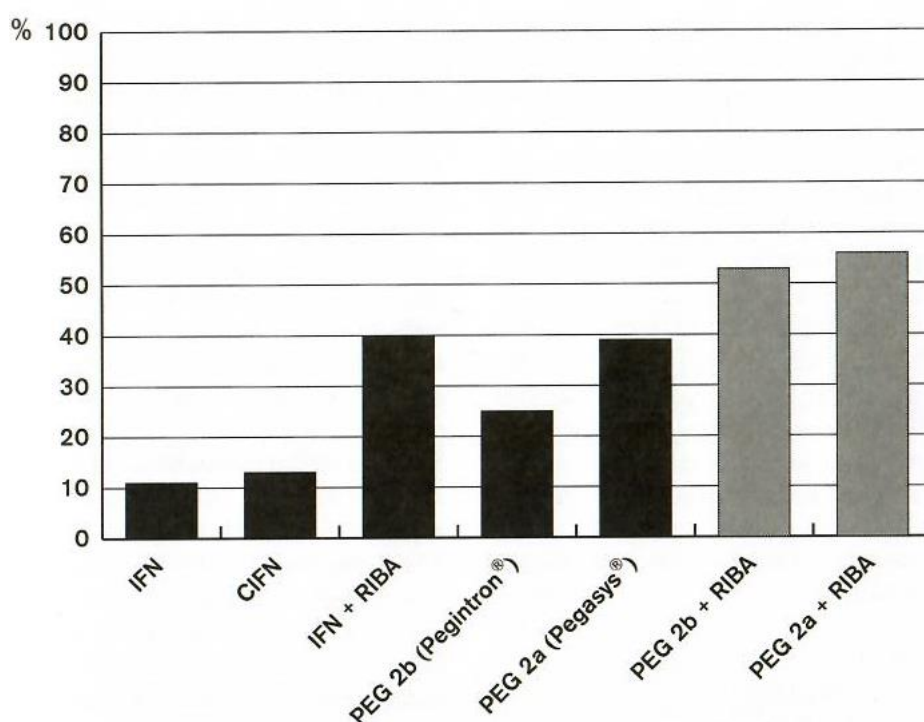
Klinicky byly používány opět dva typy PEG-INF, které se odlišovaly způsobem pegylace, tj. délkou a strukturou molekuly PEG: PEG-IFN α -2a s rozvětveným řetězcem o molekulové hmotnosti 40 kDa a PEG-IFN α -2b s lineárním řetězcem o molekulové hmotnosti 12 kDa. Oba preparáty měly tudíž i odlišné farmakokinetické vlastnosti.

Výsledky klinických studií s monoterapií PEG-IFN u VHC prokázaly procento setrvalých odpovědí srovnatelné s procentem odpovědí při léčbě dvojkombinací IFN + ribavirin^{196,197,198}.

Dvojkombinace pegylovaných interferonů s ribavirinem (2k)

Dalšího zvýšení účinku léčby bylo dosaženo využitím dvojkombinace PEG-IFN + ribavirin. Standardně byla tato léčebná kombinace zavedena v roce 2002.

Ve studii s PEG-IFN α -2a (180 μ g, 1x týdně) v kombinaci s ribavirinem (1000 – 1200 mg denně) byla v celém souboru dosažena trvalá virologická odpověď (SVR) u 56 % pacientů. Detailnější analýza léčené skupiny prokázala, že u pacientů s genotypem 1 byla dosažena SVR ve 46 % případů a u genotypů 2 a 3 byla 76 %¹⁹⁹. Podle dobových doporučení bylo léčebné schéma, konkrétně délka trvání kombinované léčby, závislé na stanovení genotypu. Infekce genotypem 1 se léčila touto dvojkombinací 48 týdnů, genotypy 2 a 3 pouze 24 týdnů¹⁹⁹. Orientační srovnání účinnosti léčebných režimů s interferony v léčbě chronické HCV infekce podává graf 3.



Graf 3 Srovnání IFN režimů dostupných k léčbě chronické VHC – procenta úspěšnosti léčby (SVR). IFN – rekombinantní interferon alfa, CIFN konsenzuální interferon, RIBA – ribavirin, PEG – pegylovaný interferon (převzato z: KREKULOVÁ, Laura a Vratislav ŘEHÁK. *Virové hepatitidy: prevence, diagnostika a léčba*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4218-4³⁰).

Léčebné režimy založené na aplikaci interferonu se standardně používaly až do roku 2010. Byly zatížené množstvím nežádoucích účinků a zpravidla špatnou tolerancí ze strany pacientů. Léčba vedla často k výraznému zhoršení kvality života. Tolerance nežádoucích účinků byla mezi pacienty velmi rozdílná. Při dlouhodobé aplikaci interferonu docházelo k rozvoji četných komplikací. Bylo třeba velmi pečlivě zhodnotit situaci konkrétního pacienta před zahájením IFN terapie a respektovat absolutní i relativní kontraindikace podávání IFN.

Interferonové režimy měly jen limitované využití u pacientů s cirhózou, často byly kontraindikovány u polymorbidních pacientů.

Podle registračních studií byla úspěšnost léčby, hodnocená tehdy jako SVR 24 týdnů po skončení farmakoterapie, 40-60 % pro genotyp 1 a kolem 80 % pro genotypy 2 a 3^{200,201}. Proto v éře interferonových režimů byla snaha o predikci léčebné odpovědi (dosažení SVR)²⁰².

Virové faktory <ul style="list-style-type: none">- Genotyp jiný než 1 – zejména genotypy 2 a 3- Nízká vstupní virémie- Malá variabilita HCV genomu v rámci hostitelského organismu (nízká frekvence kvazidruhů)
Faktory hostitelského organismu <ul style="list-style-type: none">- Nepřítomnost či nízký stupeň fibrózy / nepřítomnost jaterní cirhózy- Vysoká aktivita ALT (AST) před zahájením terapie- Aktivní jaterní zánět dle biopsie (přítomnost periportální zánětlivé celulizace)- Krátká doba trvání infekce- Nízký obsah železa v organismu- Imunokompetence organismu- Ženské pohlaví- Bílá rasa- Onemocnění získané v dospělém věku- Nižší věk dospělého nemocného- Nepřítomnost koinfekce (HBV, HIV)- Abstinence alkoholu- Nepřítomnost tělesné nadváhy- Polymorfismus IL28B – varianta CC

Tabulka 4 Faktory predisponující k příznivé odpovědi a k dosažení SVR po terapii interferonem (upraveno dle KREKULOVÁ, Laura a Vratislav ŘEHÁK. *Virové hepatitidy: prevence, diagnostika a léčba*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4218-4³⁰).

V současné době hodnotíme léčbu IFN režimy jako velmi náročnou a nekomfortní nejen pro pacienty, kteří léčbu podstupovali, ale i pro lékaře, kteří léčbu poskytovali. V dané době však nebyla jiná alternativa. Přestože z pohledu dnešních bezinterferonových režimů se SVR 95 % a více²⁰³ nebyla účinnost léčby optimální, bylo touto cestou léčeno a vyléčeno mnoho nemocných.

Vlastní zkušenost s léčbou 2k

Vlastní zkušenost s pegylovanými interferony při léčbách pacientů s komorbiditou chronické virové hepatitidy C a závislosti byla až nečekaně dobrá. Naše první zkušenosti s léčbou těchto pacientů jsou z 90. let minulého století, tedy ještě z éry nepegylovaných interferonů. V té době jsme PWID pacienty před léčbou chronické HCV ještě odesílali na navazující specializovaná vyšetření do jiných zařízení. Ukázalo se, jak je zdravotní systém v praxi pro tyto jedince špatně dostupný. Skutečnost, že pro PWID

je potřeba vytvořit systém péče, přizpůsobený jejich specifickým potřebám, je v současné době tématem odborných konferencí zaměřených na léčbu HCV. Naše zkušenost vedla již před 20 lety k vytvoření „Programu komplexní péče pro pacienty s komorbiditou závislosti“, který se postupně rozrostl o další specializace a nabízí pacientům komplexní službu na jednom místě. Zjistili jsme, že úspěšnost léčby chronické HCV infekce u PWID byla vyšší, než byla publikovaná data v té době. Začali jsme se léčbou PWID pacientů systematicky zabývat a vznikla klinická studie, podporovaná NIH grantem. Výsledky této práce byly opakovaně prezentovány, data z léčby PWID pegylovanými interferony jsme představili v roce 2010 na konferenci INSHU (International Network on Hepatitis in Substance Users).

Potvrdilo se, že při správném přístupu a motivaci klientů k léčbě, lze dosáhnout dobrých léčebných výsledků též ve skupině PWID, která byla a je všeobecně považovaná za obtížně léčitelnou skupinu pacientů. Při nastavení vhodných podmínek pro léčbu byli PWID schopni i přes svoji závislost na drogách při léčbě spolupracovat, užívat léky a aplikovat si interferony. Dosažené výsledky byly statisticky významně lepší, než v běžné populaci z registračních studií i řady dalších prací^{200,201}.

Vyhodnotili jsme soubor 345 klientů léčených v letech 2005-2010 s komorbiditou závislosti. Pacienti byli léčeni v té době standardním dvojkombinačním schématem (2k): pegylovaný interferon aplikovaný 1x týdně + ribavirin v denní dávce 800 -1200 mg podle tělesné hmotnosti léčeného jedince a stanoveného genotypu. Doba léčby byla 48 týdnů pro genotyp 1 a 24 týdnů pro genotypy 2 a 3, jiné genotypy se v rámci prezentované studie v PWID populaci neobjevily. Celkem bylo léčeno 204 mužů a 141 žen. Poměr mužů a žen v léčené skupině koreloval s větším zastoupením mužů mezi závislími. Průměrná hmotnost mužů 78,1 kg a žen 63,1 kg. Průměrný věk léčené skupiny byl 28,4 roku.

Více než čtvrtina pacientů (26 %) měla vstupně normální hodnoty ALT. Všichni pacienti byli bez koinfekce s jinou hepatitidou či HIV a byli naivní – tedy bez předchozí zkušenosti se specifickou virostatickou léčbou. Průměrná doba trvání HCV infekce v popsaném souboru byla 3,83 roku. Většina léčených klientů brala drogy minimálně 3 roky, více než polovina preferovala opiáty.

Práce s klienty před zahájením léčby chronické HCV dvojkombinací, tzv. předléčebná fáze, trvala průměrně 14,2 měsíců (0-72 měsíců). Pro úspěch léčby chronické HCV infekce byla právě tato fáze klíčová. V rámci přípravy na terapii HCV jsme se zaměřili na motivaci klienta k léčbě, snažili jsme se ho základně stabilizovat v rámci jeho závislosti a řešit jeho sociální situaci. Pod pojmem stabilizace závislosti je schováno široké spektrum možných problémů a jejich řešení. Od úplné abstinence, kterou jsme před léčbou striktně nevyžadovali, po převedení pacienta na substituční léčbu, případně zajištění pravidelných konzultací s psychologem nebo psychiatrem u klientů s preferencí budivých aminů. Často jsme řešili problematiku bezdomovectví, následky kriminální činnosti klientů a nástupy do výkonu trestu odnětí svobody (VTOS). Jak již bylo zmíněno, dávno před aktuálně platným standardem léčby, který indikuje léčbu u aktivních uživatelů psychoaktivních látek, jsme od našich pacientů před léčbou striktně nevyžadovali abstinenci. Podmínkou pro zahájení léčby byla motivace klienta k léčbě a schopnost spolupracovat, tedy docházet na vyšetření před zahájením léčby, dodržovat stanovené termíny kontrol, schopnost být v kontaktu s psychologem a podstoupit před zahájením léčby také psychiatrické vyšetření k posouzení a stabilizaci případných dalších psychiatrických komorbidit. Pro klienty bylo nepochybně ulehčením, že všechna vyšetření a odborná konziliární vyšetření včetně provedení jaterní biopsie probíhala v rámci jednoho pracoviště doslova pod jednou střešou. Léčba chronické HCV infekce je v rámci Programu komplexní péče v Remedisu nedílnou součástí léčby závislosti. Léčbu a vyléčení HCV infekce považujeme za jeden z kroků, který je nutný pro zdravotní rehabilitaci pacienta a jeho integraci zpět do společnosti.

Dalším důvodem proč léčebný režim dvojkombinací (2k) dobře fungoval byla, kromě vhodně nastavených podmínek péče, také skladba pacientů. Podskupinu PWID v ČR v 90. letech a v první dekádě druhého milénia tvořili převážně mladí, z pohledu interní medicíny většinou zdraví jedinci, bez interních onemocnění. Většina pacientů měla přiměřenou či spíše nižší tělesnou hmotnost. Při nízkém věku a délce závislostní kariéry se jednalo o jedince, kde předpokládaná délka nákazy HCV nebyla delší než 20 let, zpravidla ještě neměli cirhózu ani pokročilé jaterní onemocnění. Vzhledem k již zmíněnému nízkému BMI netrpěli často ani jaterní steatózou. V rámci Programu komplexní péče pacienti poměrně dobře spolupracovali. Díky systému kontrol, edukačních materiálů a telefonických upomínek dosahovali velmi dobré adherence k léčbě.

V době, kdy tato práce probíhala, bylo standardem vyhodnocovat setrvalou virologickou odpověď tedy SVR ve 24. týdně po vysazení farmakoterapie. Nutnost dlouhodobého sledování při léčbě a po léčbě, ještě akcentovala potřebu dobré spolupráce s PWID na terapii. Výsledky shrnuje následující tabulka.

	RVR		EVR		ETR		ITT – SVR	
	4. týden v léčbě		12. týden v léčbě		24./48. týden – konec léčby		24. týden sledování (FU)	
Genotyp (GT)	1(4)	Non – 1	1(4)	Non – 1	1(4)	Non – 1	1(4)	Non - 1
HCV RNA negativní	131 (55,0%)*	82 (82,8%)*	212 (88,7%)*	94 (94,0%)*	215 (89,2%)*	86 (85,1%)*	195 (80,9%) ITT	85 (84,2%) ITT
HCV RNA pozitivní	97	13	21	2	7	3	26	6
Výsledky nejsou k dispozici	8	4	3	2	9	6	0	0
Ztraceni ve sledování (lost of follow up -FU)	3	0	3	0	10	6	21	10
Celkem	239	99	239	100	241	101	242**	101**

Tabulka 5 Výsledky léčby PWID pacientů 2k režimem v Programu komplexní péče (*průběžné výsledky léčby, ** u 2 osob nebyl určen genotyp, RVR – rapid virological response, EVR – early virological response, ETR – end of treatment virological response, F/U - follow-up).

Při zhodnocení dosažených výsledků, nebyl pro dosažení SVR zásadní ani genotyp. Ukázalo se, že spolupracující PWID s HCV genotypem 1 dosáhli SVR přes 80 % ITT, což byl, hodnoceno optikou té doby, mimořádný výsledek.

Součástí studie bylo i dlouhodobé sledování pacientů a vyhodnocení četnosti reinfekcí. Celkem 76 % pacientů z prezentované studie bylo v kontaktu a hodnoceno ještě minimálně 3 roky po dosažení SVR. Byly zaznamenány 2 reinfekce, tedy frekvence reinfekcí byla 0,6 % na osobu a rok. Ještě jedna reinfekce byla zaznamenána po 5 letech sledování po SVR.

7.3. Nová virostatika v léčbě virové hepatitidy C

Revolucí v léčbě chronické HCV jsou přímo působící virostatika (directly acting antivirals – DAA). Jedná se o nízkomolekulární látky, které cíleně blokují funkci některého z HCV enzymů esenciálního pro virovou replikaci. DAA rozdělujeme podle cílového proteinu na proteázové inhibitory (NS3/4A), inhibitory NS5A a polymerázové inhibitory NS5B RdRp. V případě proteázových inhibitorů rozlišujeme ještě jednotlivé generace léčiv, jiné třídy DAA se dělí podle chemického složení na nukleos(t)idové inhibitory nebo inhibitory nenukleos(t)idové povahy.

Jednotlivé DAA třídy mají zpravidla vícečetné efekty na blokování replikace HCV v hostitelské buňce, což je dáno polyfunkčností cílových HCV proteinů.

Proteázové inhibitory

Zjednodušeně můžeme konstatovat, že NS3/4A proteázové inhibitory blokují stříhací funkci NS3 proteázy. Do fázi klinického zkoušení se dostaly až nízkomolekulární inhibitory NS3/4A, které využívají principu falešného substrátu cílového enzymu²⁰⁴.

V léčbě se začaly jakou první používat lineární deriváty α -ketoamidu boceprevir a telaprevir (dnes první generace proteázových inhibitorů), které tvoří reverzibilní kovalentní vazbu s cílovou molekulou. Ukázalo se, že vazba molekuly proteázového inhibitoru (PI) blokuje nejen proteázovou, ale též helikázovou aktivitu NS3/4A, tedy rozplétání obou vláken HCV RNA při transkripci a tím přímo replikaci HCV RNA^{205,206,207}.

Proteázové inhibitory (PI) první generace: boceprevir, telaprevir a simeprevir byly přidávány do režimů s interferonem a ribavirinem. Přestože zvyšovaly pravděpodobnost dosažení SVR, pro pacienty představovaly trojkombinační režimy s interferonem ještě větší zátěž vzhledem k četnosti nežádoucích účinků²⁰⁸. První generace PI, na rozdíl od aktuálně užívaných virostatik, měla své vlastní vedlejší účinky, které již tak špatnou toleranci léčby ještě zhoršovaly.

Inhibitory NS5A

Tato třída DAA má rovněž minimálně dvojitý mechanismus účinku. V první fázi blokuje kompletaci a uvolnění virionů HCV z hepatocytů²⁰⁹. Následně se podílí na blokádě vlastní replikace HCV RNA. NS5A nemá vlastní enzymatickou aktivitu, je kofaktorem NS5B RdRp. Je zásadní pro replikaci HCV RNA, kompletaci virionu a modulaci řady intracelulárních signálních drah^{89,210,211}. Pro kompletaci HCV partikulí je esenciální membránová síť (MW), na níž se NS5A spolupodílí. Pro tvorbu MW je podstatná interakce NS5A a fosfatidylinositol-4-kinázy III alfa (PI4KIII α)²¹². Inhibice interakce s PI4KIII α inhibitory NS5A vede k blokádě tvorby membránové sítě^{213,214,215}.

Inhibitory NS5A jsou velmi efektivní a jsou klíčovými léky pro eradikaci HCV, proto jsou součástí téměř všech fixních kombinací DAA (viz níže) schválených k léčbě HCV infekce^{216,217,218,219}. Jejich účinnost částečně limituje genetická heterogenita HCV. Další problém inhibitorů NS5A je v postupném rozvoji rezistentních mutací HCV nebo již preexistujících virových kmenů, které na inhibitory NS5A nejsou optimálně citlivé. Proto je nelze používat v monoterapii, ale pouze v kombinaci s PI nebo s inhibitory NS5B RdRp. Inhibitory NS5A se vážou na první doménu tohoto nestrukturálního virového proteinu; substituce asociované s rezistencí (RAS) na NS5A mění strukturu této domény²²⁰.

Podstatně častější je scénář, kdy se substituce v první doméně vyskytuje v naivní virové populaci, která se dosud s žádným inhibitorem nesesetkala. Pro tuto virovou populaci používáme označení RAV – varianta (kvazidruh) asociovaná s rezistencí. Zejména tyto preexistující bodové mutace (RAV), v jejichž

důsledku dochází po změně tripletu i k záměně aminokyseliny na dané pozici, vedou k nižšímu efektu nebo až k selhání léčby. Významnost a konečný efekt RAV mutace na terapii HCV závisí podle očekávání na použité kombinaci DAA. Robustní kombinace DAA mají zpravidla jen minimum nonresponderů v důsledku RAV. Přestože účinnost DAA léčebných režimů je všeobecně velmi vysoká a to i mezi jedinci s detekovatelnou RAV mutací, předléčebné mutace NS5A prokazatelně snižují účinnost terapie, v závislosti na použité kombinaci a patientské skupině^{221,222,223,224,225}.

Vezmeme-li v úvahu množství nakažených osob, které jsou nebo budou léčeny DAA režimy, i zlomek procenta selhaných léčebných případů povede pravděpodobně k selekci a následnému šíření multi-resistentních HCV izolátů v populaci. Pokud se nepodaří HCV dostatečně rychle eradikovat, dojde časem k rozšíření těchto rezistentních kmenů a ke snížení účinnosti dostupných léčebných režimů^{222,223,224}.

Prvním inhibítorem NS5A, který úspěšně prošel přes klinické testování do klinické praxe, byl daclatasvir^{226,227}, následován ledipasvirem a ombitasvirem. Nové výzkumy testovaly účinnost jednotlivých NS5A inhibítorů, používaných v klinické praxi na dosud popsané HCV genotypy 1-7. Zjistily, že pibrentasvir a velpatasvir - nejnovější z dosud schválených NS5A inhibítorů mají shodnou a velmi vysokou pangentypovou aktivitu^{216,217,228}.

Inhibitory NS5B RdRp

Tuto skupinu dělíme dále na nukleos(t)idové a nenukleos(t)idové inhibitory.

Nukleos(t)idové inhibitory (NI) působí přímo na aktivním katalytickém místě cílového enzymu. Jejich integrace do vznikajícího řetězce RNA vede k přímému ukončení řetězce nebo k následným fatálním chybám v sekvenci vznikající RNA, že dochází k jejímu zániku²²⁹. Aktivní místo RdRp je vysoce konzervativní, proto je aktivita této třídy DAA stejná pro všechny HCV genotypy. Tato třída má též malou četnost vzniku rezistencí. Přes popsané příznivé vlastnosti NI nepoužíváme v monoterapii²³⁰.

Nenukleos(t)idové inhibitory (NNI) RdRp způsobují změny konformace polymerázy vazbou na alosterická místa na jejím povrchu. To vede ke snížení enzymové aktivity. Na rozdíl od NI není pangentypová účinnost a mají nižší genetickou bariéru pro vznik rezistencí²³¹.

V klinické praxi se od počátku zavedení DAA do léčby chronické HCV infekce začaly používat kombinované režimy – iniciálně (první generace proteázových inhibítorů) v kombinaci s interferonem a ribavirinem, následně kombinace jednotlivých DAA různých tříd.

Ještě roce 2014 proběhly 2 klinické studie s trojkombinací DAA + PEG IFN a ribavirin. Jednalo se o studii Quest s trojkombinací simeprevir (druhá vlna první generace proteázových inhibítorů), PEG IFN a ribavirin, která byla účinná pro pacienty infikované genotypy 1 a 4^{232,233}.

Další studie Neutrino ve stejném roce testovala kombinaci sofosbuviru (nukleotidový inhibitor NI) v kombinaci s PEG IFN a ribavirinem. Tato 12 týdenní léčba byla účinná bez ohledu na genotyp, kterým byl pacient infikován. SVR byla dosažena u 89 % pacientů s genotypem 1 a 96 % pacientů s genotypem 4²³⁴. Rovněž u pacientů s cirhózou byla zaznamenána vysoká účinnost a až 80 % dosáhlo SVR. U pacientů s genotypy 2 a 3, dříve neúspěšně léčených dvojkombinací PEG IFN a ribavirin, bylo v rámci studie s popsanou trojkombinací dosaženo SVR v 96 % respektive v 83 % případů²³⁵.

V EU byla schválena i kombinace PEG IFN + ribavirin a daclatasvir, která ale v klinické praxi nakonec používána nebyla^{236,237}.

DAA režimy a fixní kombinace

Do klinické praxe se v rámci programů časně dostupnosti dostala kombinace sofosbuviru a daclatasviru (SOF 400 mg 1x denně + DCV 60 mg 1x denně). Tato kombinace byla určena hlavně pacientům s pokročilým jaterním onemocněním a po transplantaci jater. Byla k dispozici v ještě před zavedením tzv. fixních kombinací DAA (viz dále v textu) do klinické praxe^{238,239}.

Začátek přelomové a tolik očekávané bezinterferonové éry zahájily studie (fáze II) s kombinacemi asunapreviru a daclatasviru (DCV) pro nemocné s genotypem 1²⁴⁰ a sofosbuvir s ribavirinem pro pacienty s genotypem 2 a 3²⁴¹. Pro genotyp 1 byla krátce používána i kombinace sofosbuvir a simeprevir²⁴².

Perorálně podávané kombinace DAA byly dobře snášeny, odpadly nežádoucí účinky indukované interferonem a byly vhodné k použití i pro pacienty s cirhózou.

Koncem roku 2014 začala v USA éra tzv. fixních kombinací, tedy bezinterferonových léčebných režimů, které byly po vzoru HAART (highly active antiretroviral therapy) v jedné či několika málo tabletách. DAA režimy mají minimum nežádoucích účinků a vysokou terapeutickou účinnost proti HCV. Vždy se jedná o kombinaci minimálně dvou výše popsaných skupin přímo působících virostatik. Bez výjimky všechny fixní kombinace zvyšují komfort a tím i compliance léčeného pacienta. Použití některých kombinací bylo a je ještě stále vázané na určitý genotyp. Nejnovější fixní kombinace jsou již pangentypové.

První fixní kombinací na trhu byla kombinace sofosbuviru (SOF 400 mg) a ledipasviru (LDV 90 mg) v jedné tabletě. Dávkování je 1 tbl 1x denně 8 až 12 týdnů pro pacienty s genotypem 1 a 4 dle pokročilosti onemocnění a případné předchozí neúspěšné terapii IFN režimy^{243,244,245,246,247}. Přidání ribavirinu nebo prodloužení léčby na 24 týdnů mělo pozitivní efekt na zvýšení podílu SVR při přítomnosti jaterní cirhózy u pacientů, kteří již dříve neúspěšně podstoupili léčbu^{248,249,250}. Kombinace je určena pro pacienty s genotypy 1, 4, 5 a 6²⁵¹.

Další fixní kombinací byla trojkombinace 3D ombitasviru (OMB) s ritonavirem potencovaným paritaprevirem (r/ PTV a OMB – v jedné tabletě v dávce 2tbl 1x denně) a dasabuvirem (DSV 1 tbl 2x denně). Tato léčba byla určena pouze pro pacienty s genotypem 1. Pro subtyp 1a bylo doporučeno ještě přidání ribavirinu k fixní kombinaci. Dle klinických studií^{252,253,254,255} byla doporučená doba léčby 12 – 24 týdnů podle klinické situace. Prodloužená léčba byla doporučena pro již dříve neúspěšně léčené pacienty s jaterní cirhózou s genotypem 1a.

Dvojkombinace OMB a r/PTV je dostatečně účinná pro pacienty s genotypem 4²⁵⁶.

V roce 2016 byla registrována kombinace sofosbuviru s velpatasvirem (SOF 400 mg + VEL 100 mg 1 tbl 1x denně)²⁵⁷. Jedná se již o pangentypovou kombinaci, ale pro pacienty s cirhózou s genotypem 3 je doporučeno ještě přidání ribavirinu²⁵⁸.

Kombinace grazopreviru – NS3 PI (GZR 100 mg) a inhibitoru NS5A - elbasviru (EBR 50 mg) 1 tbl 1x denně je určena pro nemocné s genotypy 1, 4 a 6^{259,260,261}. Doba léčby je standardně 12 týdnů, u pacientů s genotypem 1a bylo doporučeno testovat před léčbou RAV mutace. Při jejich detekci bylo doporučeno přidání ribavirinu do kombinace a prodloužení léčby na 16 týdnů^{262,263}. Přítomnost pokročilého jaterního onemocnění a jaterní cirhózy nevedla k poklesu účinnosti. Kombinovaný preparát je eliminován hepatálně, je tedy možné a bezpečné jeho podávání u hemodialyzovaných osob²⁶⁴.

V roce 2017 byla registrována další kombinace: sofosbuvir (SOF 400 mg) + velpatasvir (VEL 100 mg) a voxilaprevir (VOX 100mg) - pangentypový proteázový inhibitor. Užívá se opět 1 tbl 1x denně²⁶⁵. Dle

předchozí expozice léčbě je doba léčby 8-12 týdnů. Jedná se o další pangenotypový režim²⁶⁶. Kombinace je účinná i u pacientů po předchozí neúspěšné terapii jiným DAA režimem²⁶⁷.

Zatím poslední dostupná kombinace je PI glecaprevir (GLE 300 mg s inhibitorem NS5A pibrentasvir (PIB 120 mg). Jde opět o kombinaci s pangenotypovou účinností a výbornou tolerancí. Ordinuje se v jedné denní dávce po dobu 8 až 16 týdnů podle konkrétní klinické situace²¹⁷. Denní dávka je ve třech tabletách, které se užívají najednou s jídlem nebo po jídle, ideálně ráno se snídaní²⁶⁸.

Výběr nejvhodnější léčebné kombinace pro daného pacienta závisí na pokročilosti jaterního onemocnění, dostupnosti léčiva v daném regionu a na genotypu či subtypu HCV. V amerických doporučeních je již zmíněna i varianta nestanovit genotyp a použít pangenotypový léčebný režim¹⁸¹.

Bezinterferonové režimy, vhodné pro jednotlivé genotypy a klinické situace shrnuje tabulka 6.

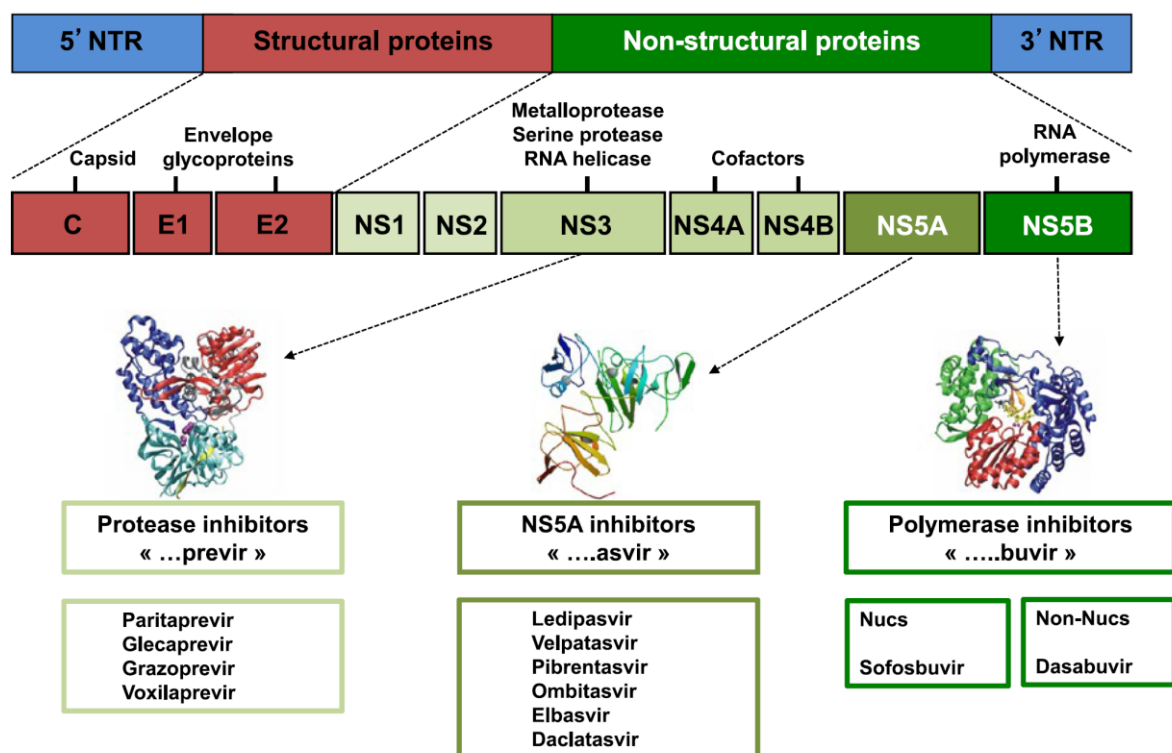
HCV GT	Anamnéza	SOF/VEL (týdny)	GLE/PIB	SOF/VEL/VOX	SOF/LDV	GZR/EBR	OBV/PTV/r + DSV
GT 1a	TN	12	8	NE	8-12	12 HCV RNA ≤ 800 000 IU/ml	NE
	TE	12	8	NE	NE	12 HCV RNA ≤ 800 000 IU/ml	NE
GT 1b	TN	12	8	NE	8-12	8 (F0-F2) ⁺ 12 (F3)	8 (F0-F2) 12 (F3)
	TE	12	8	NE	12	12	NE
GT 2	TN	12	8	NE	NE	NE	NE
	TE	12	8	NE	NE	NE	NE
GT 3	TN	12	8	NE	NE	NE	NE
	TE	12	16	NE	NE	NE	NE
GT 4	TN	12	8	NE	12	12 HCV RNA ≤ 800 000 IU/ml *	NE
	TE	12	8	NE	NE	NE	NE
GT 5	TN	12	8	NE	12	NE	NE
	TE	12	8	NE	NE	NE	NE
GT 6	TN	12	8	NE	12	NE	NE
	TE	12	8	NE	NE	NE	NE

Tabulka 6 Léčebné režimy pro pacienty bez cirhózy. TE – opakovaně léčení pacienti, TN neléčení (naivní) pacienti (převzato ze Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV). *Česká hepatologická společnost: České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně* [online]. 2019 [cit. 2020-01-13]. Dostupné z: <https://www.ces-hep.cz/file/596/2018-guidelines-hcv-chssil-1.pdf>¹⁸⁰).

Díky výše popsaným novým léčebným režimům došlo k zásadnímu zjednodušení a zefektivnění léčby chronické HCV infekce. S ohledem na minimum nežádoucích účinků již není léčba pro nemocné nepříjemnou životní etapou. Naopak je snadná, krátká, prakticky bez komplikací a při znalosti lékových interakcí je pro pacienty velmi bezpečná. Cílem léčby je stále eradikace viru. Naším hlavním cílem v současné éře však není pouze eliminace viru u konkrétního léčeného jedince a jeho vyléčení, ale globální eliminace HCV infekce jako takové. Aktuální léčebné režimy jsou pro tento ambiciózní cíl dostatečné.

7.4. Léčba akutní HCV infekce

Pacienti s diagnostikovanou akutní HCV infekcí jsou rovněž kandidáty léčby. V těchto případech je cílem zabránit přechodu infekce do chronicity. Zahájení léčby DAA režimy u akutních infekcí je nákladově efektivní. Vzhledem k převaze asymptomatických průběhů akutních HCV infekcí a malému počtu léčených pacientů nevíme, kdy je vhodný moment pro zahájení terapie, neznáme ideální dobu léčby ani optimální léčebný režim. Podle dostupných studií s touto problematikou je minimální doba léčby 8 týdnů, lze použít pangenotypové fixní kombinace. Podávání DAA v rámci postexpoziční profylaxe indikované není^{180,181}.



Obrázek 7 Třídy DAA a jejich rozdělení podle cílových HCV proteinů (převzato z: ASSELAH, Tarik, Patrick MARCELLIN and Raymond F. SCHINAZI. Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure?. *Liver International*. 2018, **38**(2), 7-13. DOI: 10.1111/liv.13673. ISSN 14783223. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/liv.13673>²⁰³).

8. Globální eliminace HCV infekce

8.1. Plán globální eliminace HCV infekce v EU

V 2016 prezentovala WHO akční plán, jehož cílem je získat kontrolu nad šířící se HCV infekcí a následně toto onemocnění eradikovat²⁶⁹. Plán globální eliminace HCV infekce předpokládá naplnění následujících cílů do roku 2030:

- dosáhnout 65% poklesu mortality v souvislosti s jaterními onemocněními
- snížit počty nových HCV infekcí o 90 %
- zvýšit podíl diagnostikovaných infekčních pacientů na 90 %^{5,269}.

Matematickým modelováním při kvalifikovaném odhadu aktuální epidemiologické situace v EU vypadá plán globální eliminace HCV infekce dle WHO v EU v číslech následně: počet viremických subjektů v EU v roce 2015 je odhadován na 3 238 000 z celkového počtu 509 868 000 obyvatel Evropské unie. Prevalence viremických osob v EU je odhadována na 0,64 %. V roce 2015 bylo v EU 1 180 000 obyvatel s již diagnostikovanou HCV infekcí. 150 000 nemocných bylo v roce 2015 v EU specificky léčeno pro chronickou HCV. 133 000 léčených dosáhlo setrvalé virologické odpovědi (SVR), tedy bylo uzdraveno. Kontinuální přenos HCV infekce, který v regionu EU probíhá, vedl v roce 2015 k 57 900 novým případům. To znamená 11,4 nových HCV infekcí na 100 000 obyvatel EU. Odhaduje se, že ve stejném roce přišlo do Evropy 30 400 migrantů s HCV infekcí²⁷⁰.

Abychom dosáhli eliminace HCV infekce, je potřeba v souladu s doporučením WHO změnit a zintenzivnit dosavadní diagnostické a léčebné strategie. Přestože je EU velmi vyspělý a ekonomicky silný WHO region, má v prevenci a léčbě HCV infekce v současné době značné rezervy. EU se 3,2 miliony viremických obyvatel, můžeme srovnávat s USA, kde je infikovaných 3,2 až 3,5 milionů osob²⁷¹. V EU je diagnostikováno pouze 36 %, zatímco v USA až 50 % nemocných²⁷². Ještě patrnější je propad evropských zdravotních služeb, pokud srovnáme počty léčených. V roce 2015 bylo v EU léčeno celkem 150 000 nemocných, zatímco v USA ve stejném roce 260 000 osob^{9,10}.

Se zavedením DAA do léčby HCV v EU od roku 2014 se první cíl, tedy snížení počtu úmrtí v souvislosti s pokročilou HCV infekcí jeví jako reálný a dosažitelný. Přibližně 80 % hepatocelulárních karcinomů v EU se rozvine u pacientů s HCV infekcí. DAA režimy na rozdíl od předchozích terapeutických možností mají signifikantně vyšší proporci SVR. Navíc jsou indikované a dobře tolerované i u pacientů s komorbiditami nebo pokročilým jaterním onemocněním, což bylo při léčbě režimy s interferonem zásadním limitem^{273,274}.

Díky zavedení DAA do léčby HCV infekce je v EU od roku 2014 jasně patrný nárůst léčených pacientů. V roce 2013 se v EU léčilo 67 000 pacientů, v roce 2015 již 150 000. Zdaleka ne všech 150 000 nemocných bylo léčeno DAA režimy. V současné době v některých zemích EU nadále pokračuje léčba HCV režimy s interferonem, vzhledem k dosavadní vysoké ceně DAA léčby. Úspěšnost terapie je počítána nikoliv jen na DAA režimy, ale na kombinaci léčebných schémat a SVR je odhadnuta na 89 %. Aby bylo dosaženo cíle WHO a došlo k poklesu nových infekcí v roce 2030, musí se počet léčených osob zvýšit z dosud léčených 150 000 za rok na 187 000 do roku 2025, při použití výhradně DAA režimů s více než 95 % SVR. Pokud by se v rámci EU nepodařilo sjednotit léčebné režimy a nedošlo by k výhradnímu používání DAA v léčbě HCV se SVR kolem 95 % a SVR by se stále pohybovala jen kolem 80 %, bylo by potřeba každoročně léčit ještě více nemocných – odhadem 192 000 od roku 2020.

Pokrytí zdravotní péče není v rámci EU homogenní. Pacienti z 5 zemí (Španělsko, Itálie, Německo, Francie a UK) tvořili více než 80 % všech léčených v roce 2015. Pouze 3 země (Holandsko, Německo a Francie) léčilo více než 10 % infikované populace v roce 2015. Léčit více než 10 % infikovaných je jedna z podmínek, nutných k dosažení poklesu nových infekcí v dané populaci a postupný cíl k dosažení plánované eliminace HCV infekce v roce 2030 dle WHO⁵.

Ještě větší výzvu představuje požadavek na snížení počtu nových HCV infekcí. PWID představují v EU nejrizikovější skupinu pro přenos HCV. Rovněž poměr nových HCV infekcí mezi HIV pozitivními homosexuálními muži má tendenci k nárůstu z 0,9 -2,2 na 23,4 až 51,1 nových infekcí na 1000 osob za rok mezi lety 1990 až 2007. Pouze širší nabídka harm-reduction programů a nelimitovaná léčba DAA režimy v rizikově se chovající populaci povede reálně ke snížení rizika nových infekcí v této skupině. Nová strategie „léčba jako prevence HCV“ mezi PWID je efektivní²⁷⁵.

Pro globální eradikaci HCV je klíčový snadný a otevřený přístup k diagnostice a terapii pro všechny infikované subjekty. Velmi důležité je rovněž, aby léčba co největšího počtu infikovaných osob proběhla v krátkém časovém období několika let. Jedině tak můžeme dosáhnout významného poklesu zdrojů infekce a tím omezit nejen riziko reinfekcí v rizikově se chovajících subpopulacích, ale i vznik rezistencí.

Bude třeba přehodnotit vstupní kritéria pro zařazení pacientů do DAA léčby. V současné době je v Evropě většinou vyžadováno mírně pokročilé onemocnění (Metavir F2) pro splnění kritérií k léčbě. Do budoucna bude potřeba léčit všechny viremické pacienty, bez ohledu na pokročilost jaterního onemocnění.

Další zásadní potřeba je rozšíření screeningu antiHCV pozitivních. Aby bylo možno více léčit, musí se zvýšit počet jedinců, u kterých bude HCV infekce diagnostikována. Podle kvalifikovaných odhadů je potřeba místo 88 800 nových záchytů HCV v roce 2015, diagnostikovat minimálně 180 000 infikovaných jedinců v roce 2025.

Tento postup povede k redukci nových infekcí a 65% snížení úmrtí na jaterní onemocnění - tedy pouze 148 000 těchto úmrtí v roce 2023. Počty osob s dekompenzovanou jaterní cirhózou se sníží o 60 % a výskyt HCC o 70 % jako důsledek rozšířeného testování a léčení chronické HCV v EU. Nabídka léčby DAA režimem při diagnóze tohoto onemocnění může v globálním měřítku zabránit 640 000 úmrtí na jaterní cirhózu a rakovinu jater²⁷⁶.

8.2. Podmínky globální eliminace HCV infekce

Pokud se současná léčebná strategie nezmění podle výše uvedených doporučení, klesne sice mortalita, ale počet nových infekcí zůstane nadále vysoký. V EU neklesne incidence HCV zejména v důsledku nových infekcí a reinfekcí mezi PWID.

Doporučení léčit pouze pacienty s vyšším stupněm fibrózy (Metavir F2 a výše) velmi často vylučuje z léčby právě PWID s HCV infekcí. Většina PWID je mladá a jinak zdravá a pokud nedojde k jejich zařazení do léčby v době diagnózy z důvodu málo pokročilého onemocnění, ztratí se v dalším sledování, nebudou docházet na kontroly k lékařům a navíc budou dále šířit HCV infekci při kontinuálním rizikovém chování. Potvrzený efekt rozšířeného léčení na pokles nových infekcí platí samozřejmě také v populaci PWID. Studie jasně prokázaly, že léčba v rizikově se chovající populaci PWID vede ke snížení přenosu HCV infekce snížením zdrojů infekce v dané populaci^{277,278}. Německo, Lucembursko,

Holandsko a Portugalsko od roku 2015 zavedly neomezený přístup k DAA léčbě bez limitací pokročilostí jaterní choroby a dalších. Od roku 2016 se k této strategii přidala i Francie.

Již uvedená skutečnost, že skoro 2/3 infikovaných osob o své chorobě vůbec neví, podporuje nutnost zlepšit a rozšířit dostupnost testování antiHCV protilátek v EU (a celosvětově) ²⁷². Průměrná „prodiagnostikovanost“ v EU je pouze 41,2 %! Jinými slovy v tak vyspělé oblasti jako je EU stále více než polovina infikovaných osob s HCV infekcí o svém onemocnění neví²⁷⁰. Musíme aktivně doporučovat a nabízet testování potenciálně rizikovým jedincům. Potřebujeme rozšířit testování rizikové populace a zpřístupnit zdravotní péči PWID a jinak sociálně znevýhodněným skupinám.

Pro zlepšení diagnostiky je též podstatné zvýšit informovanost populace o virové hepatitidě C, diagnostice a léčbě. Většina pacientů stále neví, že chronická HCV infekce je plně léčitelné onemocnění. Větší zájem o vlastní zdraví a zpřístupnění a usnadnění testování povede nejen ke zlepšení diagnostiky, ale i ke zvýšení povědomí o vlastním zdravotním stavu rizikově se chovajících subjektů. Podobný scénář fungoval též u HIV infekce. K diagnostice lze využít i nové technologie, umožňující velmi přesnou na PCR založenou diagnostiku přímo v terénu při odběru z kapilární krve ²⁷⁹.

8.3. Překážky plánované globální eliminace HCV infekce

Globální eliminace, tedy efektivní pokrytí infikovaných osob léčbou, má velmi zjednodušeně dva zásadní problémy.

Prvním je získání dostatečného množství finančních zdrojů k zajištění léčby, testování a práce s pacienty. Zejména v rozvojových zemích s nízkým socioekonomickým standardem je toto problém, který realizaci eradikace výrazně zpomalí a zkomplikuje. Pokud nebudou tyto ekonomiky podpořeny z jiných (zahraničních) zdrojů v rámci WHO plánu globální eliminace HCV infekce, je velmi nepravděpodobné, že budou plošně léčeny všechny osoby s replikující HCV infekcí např. v Africe či Jižní Americe²⁶⁹.

Druhým momentem, který je rovněž podstatnou komplikací při léčbách infikovaných osob, a to i v zemích s velmi vyspělou ekonomikou, které si teoreticky mohou dovolit léčit všechny infikované pacienty, je nedostupnost a tudíž i nemožnost léčby potenciálních pacientů z rizikových skupin. Právě v těchto skupinách k šíření HCV velmi aktivně dochází a jsou novými ohnisky infekce. WHO ve svých materiálech explicitně stanovila následující problematické subpopulace, kterým je třeba věnovat zvýšenou pozornost a péči:

- Injekční uživatelé drog (PWID)
- Bezdomovci
- Vězni
- Migranti z rozvojových zemí a endemických oblastí pro HCV
- MSM
- Pacienti s koinfekcí HIV/HCV
- Neinjikující uživatelé drog sdílející pomůcky k podání návykových látek
- Příjemci krevních transfuzí a produktů

S výjimkou posledně jmenované rizikové skupiny, tedy příjemců krevních produktů, jde většinou o jedince či skupiny, vyřazené z běžné populace a existující zpravidla na jejím okraji. Jedinci z uvedených skupin, které se často překrývají, mají významně omezený přístup k jakékoli zdravotní péči, včetně testování na krví přenosné nemoci a tím i k případné léčbě HCV infekce. Je popsána řada překážek, ať

již ze strany potenciálních pacientů, poskytovatelů péče nebo zdravotnického systému, které brání PWID v zahájení léčby, v udržení se v léčebném programu a úspěšném dokončení léčby HCV infekce. Velmi časté jsou stigmatizace PWID, nedostatek informací, špatná sociální situace, obavy z léčby a vedlejších účinků, nedůvěra, neempatický přístup zdravotníků a nedostatek zkušeností při práci s PWID^{164,280}.

Přestože i ostatní cesty přenosu HCV jsou významné a je potřeba dále pracovat na zajištění bezpečnosti krevních převodů a produktů z krve a plazmy, stejně jako na eliminaci iatrogenních přenosů HCV v rozvojových zemích, klíčem k úspěchu při eradikaci HCV jsou právě PWID.

Většina expertů i matematických modelů se shoduje ve zjištění, že k dosažení kontroly nad HCV infekcí je potřeba získat kontrolu nad HCV epidemií mezi PWID. Skutečnost, že PWID při eradikaci nesmíme podcenit, podtrhují následující čísla.

Podle posledního WHO odhadu, že je na světě 71 milionů osob nakažených HCV¹⁰. V souvislosti s injekční aplikací psychoaktivních látek je podle nejaktuálnějšího odhadu z roku 2019 nakaženo 6,1 milionů jedinců^{281,282}. V roce 2015 bylo 1,7 milionu nových infekcí, z toho 23 % mezi PWID^{269,283, 284}. V Evropě jsou 2/3 nových HCV infekcí v přímé souvislosti s injekční aplikací drog²⁸⁵. Globální prevalence HCV mezi PWID je odhadována kolem 40 %^{282,286}.

Aby bylo dosaženo snížení incidence podle stávajícího plánu WHO do roku 2030, je třeba v EU dostat pod kontrolu šíření HCV mezi PWID. Podmínkou této strategie je zvýšit pokrytí opiátovými substitučními programy (OST opioid substitution treatment) a výměnnými programy. V současné době pouze 1 % PWID na světě žije v oblastech s dostatečnou nabídkou harm-reduction služeb²⁸⁷.

Studie jednoznačně prokázaly, že OST snižuje riziko nové HCV infekce o 50 % mezi účastníky těchto programů a efekt substituce se zvýší až na 74 % při současném používání výhradně nových sterilních pomůcek k injekční aplikaci²⁸⁸. Při nižší efektivnosti harm-reduction (HR) služeb v některých oblastech, bude eliminace HCV infekce zdlouhavá a nebude jí dosaženo ani do roku 2050 a to i v případě, že ostatní opatření a výše popsané intervence budou fungovat^{288,289}.

Tato zjištění, spolu se skutečností, že reinfekce mezi rizikově se chovajícími PWID hraje zásadní roli ve zpomalení eliminace HCV, zdůrazňují potřebu prevence nových infekcí a dalších intervencí mezi PWID jako klíčovou pro dosažení WHO cílů v globálním měřítku. V boji o eliminaci HCV infekce se PWID stávají klíčovou podskupinou, jejíž dostatečné zajištění musí být součástí národních plánů a prioritou ve zdravotní politice. Cílený a proaktivní přístup a „léčba jako prevence“ HCV mezi PWID povede k eliminaci HCV jen tehdy, pokud půjde ruku v ruce s komplexní léčbou a s harm-reduction programy v daných komunitách^{290, 291, 292, 293}. Dostupnost terapie HCV pro PWID a počty specificky léčených PWID byly a jsou stále velmi nízké^{294,295}.

Součástí eliminační strategie musí být odstranění systémových překážek, jako je kriminalizace PWID nebo restrikce při dosažení léčby HCV u aktivních uživatelů psychoaktivních látek^{296, 297}. Studie z reálného života potvrdila, že současné užívání drog při léčbě HCV DAA režimem nesnižuje pravděpodobnost vyléčení a dosažení SVR^{298,299}.

Zkušenosti ze Skotska, kde byl zahájen národní akční plán pro eliminaci HCV, ukazují, že tento přístup je správný a vede k dosažení požadovaných postupných cílů³⁰⁰. Realizace podobného programu je závislá na politické podpoře, na vyjasnění zdravotních priorit a dostatečných finančních prostředcích¹⁶⁴. Finanční zdroje budou hlavním limitem v zemích s nízkým hrubým národním produktem a tyto oblasti představují velkou výzvu pro globální eliminaci HCV³⁰¹.

Mezi PWID jsou další překážkou plánované eradikace reinfekce. V literatuře jsou zatím dostupné převážně práce sledující reinfekce po předchozí terapii HCV interferonem. Riziko reinfekce bylo 6 % za rok u pacientů, kteří pokračovali v injekční aplikaci drog po skončení léčby^{302,303,304}.

Po léčbě DAA byl počet reinfekcí 4,2 na 100 osob za rok - podle pozorování mezi 74 účastníky studie C-EDGE CO-STAR, kteří dosáhli SVR a následně opět injekčně aplikovali drogy³⁰⁵. Je potřeba přijmout fakt, že reinfekce se budou mezi PWID objevovat pravděpodobně s ještě vyšší frekvencí. Je to důsledek jejich základního onemocnění - závislosti. Potřebujeme proto s PWID pacienty zůstat v kontaktu i po proběhlé léčbě, dále pokračovat a podporovat jejich participaci ve výměnných programech a OST a současně nabízet opakované testování HCV – ideálně 2x do roka a vždy po epizodách rizikového chování. Dostatečné pokrytí PWID léčbou DAA povede ke snížení počtu infikovaných osob a tím i následně ke snížení rizika reinfekcí při kontinuálním rizikovém chování přeléčených jedinců^{284,306,307}.

Podle posledních dat, prezentovaných na kongresu INSHU (International Network on Hepatitis in Substance Users) v Montrealu v září 2019 je systém péče o pacienty s HCV dostatečný pouze ve 12 zemích. Pouze tyto země (viz tabulka 7) jsou nyní schopny reálně dodržet doporučení WHO a dosáhnout plánovaného poklesu prevalence a incidence HCV infekce.

12 zemí s dostatečným systémem péče o pacienty s HCV schopným naplnit teze o eliminaci HCV		
Austrálie	Island	Holandsko
Egypt	Itálie	Španělsko
Francie	Japonsko	Švýcarsko
Gruzie	Mongolsko	Spojené království

Tabulka 7 Systém péče o pacienty s HCV je dostatečný pouze ve 12 zemích.

9. Cíle práce

Dlouhodobé sledování pacientů s virovou hepatitidou C v České republice, časná diagnostika, léčba a prevence šíření této infekce mezi rizikovou populací jsou hlavním tématem předložené práce.

Jednotlivé publikace a výzkum, který jim předcházely, vznikaly postupně a témata vycházela průběžně z dané situace, tak jak se vyvíjely naše znalosti a možnosti diagnostiky a léčby HCV infekce i dostupnost jednotlivých technik, metod a prostředků.

9.1. Zmapování výchozího stavu – stanovení genotypového zastoupení

Iniciálně bylo potřeba zmapovat situaci v ČR a pokusit se o stanovení genotypového zastoupení HCV mezi pacienty ve sledovaném souboru.

Prvním dílčím cílem bylo stanovení četnosti výskytu jednotlivých genotypů a subtypů HCV v infikované populaci v Praze a Středočeském kraji a sledování závislosti mezi genotypovým zastoupením a rizikovým chováním - injekčním užíváním drog.

V devadesátých letech minulého století bylo genotypové zastoupení HCV v ČR velmi uniformní, potvrzující základní vstupní hypotézu, že původním zdrojem infekce bylo několik málo zdrojů HCV

infekce z obecné populace. Zdrojoví pacienti byli pravděpodobně infikováni iatrogeně (např. transfuzí krve) ještě před objevem HCV a tedy před možností účinně bránit rozšíření HCV infekce a dárce krev testovat. Nelze vyloučit, že se jednalo o importované infekce z oblastí s vysokou prevalencí. Infekce z obecné populace se následně rozšířila mezi rizikově se chovající PWID. To vysvětluje odlišné zastoupení genotypů HCV mezi PWID v ČR v 90. letech a začátkem nového milénia ve srovnání se stavem, který panoval na západ a na jih od českých hranic^{145, 148, 154, 308, 309}.

V pilotní studii, prezentující genotypové zastoupení HCV v Praze a Středočeském kraji, byla vyslovena domněnka, že v následující letech či desetiletích dojde ke změně zastoupení genotypů (genotypovému shiftu) a situace v ČR se přiblíží ostatním vyspělým zemím Evropy a světa, kde je mezi PWID genotypové zastoupení značně variabilní s dominancí pravděpodobně vývojově mladších HCV genotypů a subtypů – zejména 1a a 3a. Práce publikovaná v roce 2019, která je průřezem sledování vývoje nemoci v jednotlivých obdobích a skupinách nemocných, tento předpoklad jednoznačně potvrdila a zdokumentovala.

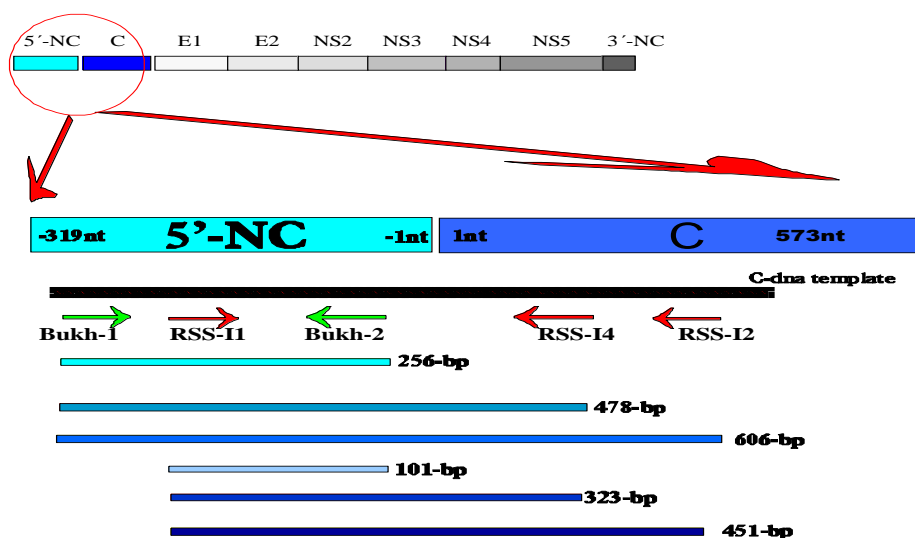
9.2. Vyvinutí nové techniky HCV genotypizace a subtypizace

Aby bylo možné vývoj onemocnění mezi nově infikovanými pacienty detailně sledovat, bylo potřeba vyvinout jednoduchou a cenově dostupnou diagnostickou techniku pro rychlé odlišení základních HCV genotypů a subtypů. Publikace dokumentuje snahu usnadnit a rozšířit možnosti virologického testování a genotypizace HCV v ČR ještě před érou běžně dostupných komerčních testovacích souprav pro prosté kvantitativní stanovení PCR HCV RNA. Stanovení jednotlivých genotypů HCV koncem 90. let minulého století nebylo v ČR dostupné.

K rychlému určení HCV genotypu respektive subtypu byla vyvinuta technika nested restriction site-specific (RSS) – PCR. Metoda je založena na užití primerů homologních k sekvencím rozpoznávanými specifickými restrikcími endonukleázami³¹⁰. RSS-PCR vychází ze stejného principu jako RFLP (restriction fragment length polymorphism RFLP), ale bez použití restrikcími endonukleáz, tedy s menšími technickými nároky³¹¹. K izolaci virové HCV RNA byla použita extrakce pomocí silikonových partikulí³¹². Primery byly zvoleny a vyvinuty tak, aby byly citlivé k 5'–NC a C regionům HCV genomu, tedy ke konzervativním lokusům, které byly užívány ke genotypizaci i jinými technikami^{115,116,313,314,315}. Základní první krok RT-PCR amplifikuje 664 párů bazí dlouhý cDNA templát. Navazující nested RSS-PCR pak generuje pomocí 5 interních primerů další PCR produkty tzv. „multiple band pattern“. Vysoce citlivé primery Bukh-1 a Bukh-2 generují produkt velikosti 256 bp¹⁵.

Tento produkt je přítomen v každém HCV RNA pozitivním vzorku bez ohledu na genotyp, slouží jako diagnostický pro přítomnost HCV RNA a současně je interní kontrolou amplifikace. Primery RSS-I1, RSS-I2 a RSS-I4 specificky odlišují HCV 1b od ostatních subtypů a genotypů. Tyto primery byly konstruovány podle sekvencí nukleotidů rozlišovacích míst restrikcími endonukleáz *Bst*UI a *Maell*. Nález pěti produktů (606, 478, 451, 323 a 256) byl vždy konzistentní s nálezem HCV subtypu 1b, pro který byly interní primery designovány (viz obrázek 8). Senzitivita i specificita RSS-PCR k odlišení HCV subtypu 1b od ostatních byly v obou případech shodně 100 %.

Výhodou vyvinuté metody je možnost provádět RSS-PCR přímo z klinických vzorků, dále jednoduchost, rychlost, reproducibilita a nízká cena. V jednom vyšetření poskytuje RSS-PCR diagnostickou informaci o přítomnosti či nepřítomnosti HCV RNA ve zkoumaném vzorku a současně v tomtéž testu umožňuje diferenciaci HCV 1b od ostatních genotypů. Primery RSS-PCR mohou být modifikovány k odlišení dalších HCV genotypů a subtypů.



Obrázek 8 Nested RSS-PCR: schéma vnitřních primerů a PCR produktů; 5'-NC – 5 nekódující oblast genomu HCV, C – C region, kódující oblast genomu HCV, Bukh-1, 2, RSS-I 1,2,4 – názvy interních primerů – viz v textu (původní obrázek autorky).

9.3. Sledování změn genotypového zastoupení v rizikové populaci

V jednotlivých publikacích je postupně zachycen začátek a průběh diverzifikace zpočátku velmi uniformní epidemie HCV v ČR.

Testování antiHCV protilátek je v ČR dostupné od počátku devadesátých let minulého století. Od roku 1992 bylo zavedeno plošné testování dárců krve na nově objevenou virovou hepatitidu C pomocí antiHCV protilátek. V průběhu devadesátých let minulého století byli postupně identifikováni a diagnostikováni jedinci z nízké rizikové populace s dosud neurčenou nonA nonB hepatitis a současně byly diagnostikovány nově infikované rizikově se chovající osoby, které injekčně aplikovaly drogy (PWID). Zatímco v obecné populaci nové případy HCV infekce diagnostikujeme s klesající frekvencí, epidemie mezi injekčními uživateli drog je stále aktivní nejen v ČR, ale i v ostatních zemích. Dochází ke stále novým přenosům a tudíž i k postupným změnám HCV izolátů a vývoji genotypového zastoupení v této subpopulaci.

Genotypový shift, který se odehrál v rozmezí dvou dekád v ČR, je velmi dobře dokumentovaný v přiložených publikacích. Původně zcela uniformní genotypové zastoupení s převahou nejstaršího

subtypu 1b v obou subpopulacích (obecná, nerizikově se chovající populace a injekční uživatelé drog – PWID) se za dobou sledování zcela zásadně proměnilo.

Počátkem diverzity bylo zachycení vysoce signifikantních bodových mutací v konzervativním koncovém nekódujícím úseku HCV genomu v 5'-NC regionu. Tyto mutace se vyskytovaly zejména v populaci PWID a dokumentovaly dynamiku a aktivitu probíhající epidemie v této skupině. Vzorky séra, které byly prospektivně získávány v letech 1998 až 2000 od pacientů z ČR z Prahy a Středočeského kraje a které byly genotypizovány přímým sekvenováním NS5B a 5'-NC úseků, byly dále podrobeny detailní sekvenční analýze.

Sekvenovány byly PCR produkty z 5'-NC regionu, nalézající se na pozici v rozsahu -276 až -50 nukleotidů – číslováno podle Choo a spoluautorů¹⁴. Získané sekvence byly porovnány s prototypovými sekvencemi HCV, které již byly deponovány v Gen Bank pomocí softwaru DNASIS.

Celkem bylo analyzováno 96 PCR produktů od jedinců infikovaných genotypem 1.

Z 22 PCR produktů subtypu 1a byly jen 2 produkty kompletně identické s referenčním PCR produktem z GenBank. Oba PCR produkty identické s referenčním 1a produktem v GenBank náležely subjektům z nerizikové podskupiny. Dalších 19 obsahovalo bodové mutace, nejčastěji substituci C za A na -138 pozici. V rámci této sekvenční analýzy jsme zachytili unikátní, dosud nepopsanou bodovou mutaci v podskupině PWID pacientů. Unikátní sekvence tohoto izolátu byla deponována do GenBank pod referenčním číslem AY725958.

Analýza 74 PCR produktů amplifikovaných od subjektů s podtypem 1b ukázala 5 různých 5'-NC variant. 66 izolátů bylo identických s referenčním PCR produktem v GenBank. Dalších 8 produktů mělo opět bodové substituce na -138 pozici a 2 produkty měly na tomto místě inkorporovaný jeden adeninový zbytek navíc. Oba HCV izoláty s unikátní bodovou mutací byly identifikovány od 2 nezávislých subjektů z nerizikové populace. Také tyto dvě unikátní 1b sekvence jsme deponovali do GenBank (AF 387732 a AF 387733). Ve 4 případech jsme detekovali bodovou záměnu T na C na pozici -94. Zde se ve všech čtyřech případech jednalo o vzorky z PWID podskupiny.

Naše sledování, zjištěné výsledky a detekované bodové mutace reflektovaly začátek divergence obou podskupin HCV infikovaných pacientů v ČR na konci milénia. Subpopulace, které se iniciálně lišily svým chováním, se postupně začaly odlišovat také rozšířením jiných HCV izolátů. Podobně, jako u jednoho infikovaného jedince sledujeme rozvoj kvazidruhů v průběhu trvání jeho chronické infekce, zde ve větším měřítku sledujeme existenci a rozšíření bodových mutací, které jsou unikátní v určité podskupině a dokumentují tím skupinově rozdílný přenos HCV infekce. Není nijak překvapivé, že větší dynamiku a tedy i více odlišností jsme zaznamenali mezi podskupinou PWID, kde je infekční prostředí podstatně aktivnější co do četnosti rizikového chování a následných přenosů HCV. Přestože limitací studie byl relativně malý počet detekovaných bodových mutací, je potřeba si znovu připomenout, že byl studován vysoce konzervativní úsek, kde je výskyt každé mutace podstatně významnější, než v jiných regionech HCV RNA. Studovaný úsek 5'-NC oblasti je součástí IRES, jehož sekundární struktura je kritická pro efektivitu HCV replikace¹⁹. Přestože se jednalo o bodové mutace, jejich záchyt v nejvíce konzervativním regionu HCV genomu svědčí o kontinuálním vývoji šíření HCV v dané rizikové skupině a o selekci vitálnějších a tedy pravděpodobně i více virulentních HCV izolátů.

9.4. Komplexní péče – klíč k léčbě; vyloučené populace - klíč k eliminaci HCV

Dvě dekády před zveřejněním mezinárodního programu WHO a vyhlášením plánu globální eradikace HCV infekce, který akcentuje zlepšení dostupnosti péče, diagnostiky a léčby a zejména zahrnutí jedinců a skupin z vyloučených komunit do léčebných režimů, vznikl pod vedením autorky na jejím pracovišti Remedis „Program komplexní péče pro pacienty s komorbiditou závislosti“. V rámci tohoto projektu mohou pacienti využít celou škálu služeb pod jednou střechou, na jednom místě, v jednom zdravotnickém zařízení. S cílem postupné dlouhodobé stabilizace je zde pacientům nabízena léčebně preventivní péče internistou a gastroenterologem, spolu s podporou psychiatra, klinického psychologa, adiktologa a sociálních pracovníků. Pacient může využít psychoterapie a/nebo substituční léčby, je komplexně vyšetřen, včetně vyšetření na krví přenosné nemoci. Infekčním pacientům je nabízena specifická protivirotová terapie (v minulosti se jednalo o dlouhodobou léčbu interferonem a ribavirinem, v současné době jsou pacienti léčeni výhradně DAA režimy). Cílem tohoto přístupu není jen léčba infekčního onemocnění, ale snaha o nastavení dlouhodobé spolupráce s pacientem a pomoc při změně životního stylu, která je nejen prevencí relapsu zneužívání návykových látek, ale i reinfekce virové hepatitidy C. Tento přístup si získal respekt mezi odborníky na léčbu závislosti a je oblíben mezi klienty. Pro závislého jedince je v běžném zdravotnickém zařízení velmi obtížné a často nemožné absolvovat sérii vyšetření, vedoucí k diagnóze HCV infekce a následně se dostat i k její léčbě. Léčba HCV probíhala a stále probíhá v centrech, kde není personál školený na kontakt se stigmatizovanou klientelou PWID. Tím je spolupráce PWID pacientů se zdravotníky velmi ztížena.

Letitá zkušenost ukázala, že při realistickém nastavení limitů, dostatečné podpoře, empatickém a neodsuzujícím přístupu a respektování specifik, která se váží k PWID pacientům s chronickou HCV infekcí, je kvalitní spolupráce možná. Při usnadnění kontaktu lze navodit kvalitní vztah lékaře – pacient – zdravotnické zařízení. Dokladem toho je i velmi vysoká účinnost léčby interferonem a ribavirinem, kterou naši pacienti díky dobré compliance v éře interferonových režimů dosahovali a která byla též opakovaně prezentována na kongresech a seminářích, ať již na lokální či mezinárodní úrovni.

V roce 2017 zahájila svoji činnost pobočka Remedis Brno, která jde v souladu se současným trendy péče o závislé ještě dál. Pro pacienty se závislostí poskytuje podobné spektrum adiktologických služeb jako pražské centrála, ale je lokalizovaná přímo v centru romské komunity v Brně. Tím se nabízená služba stává dostupnou a dobře akceptovatelnou i pro klientelu, pro kterou například cesta tramvají představuje nepřekonatelnou překážku. Výsledky popsaného konceptu péče shrnuje pilotní práce, prezentující vysokou prevalenci HCV infekce mezi brněnskými Romy. V rámci projektu bylo vyšetřeno 50 unikátních pacientů. Jednalo se o prvokontakty s adiktologickou poradnou Remedisu v Brně. Žádný z těchto pacientů dosud nebyl v evidenci a nekontaktoval naše zdravotnické zařízení v jiné lokalitě v minulosti. Pacienti se registrovali a byli vyšetřeni v období 3-12/2017. Všichni klienti byli injekčními uživateli drog (PWID). Jejich chování bylo rizikové. Docházelo ke sdílení injekčního materiálu a parafernálií při parenterální aplikaci návykových látek nebo k tetování či piercingu v neprofesionálních podmínkách - tedy nesterilními pomůckami. Velmi častou rizikovou aktivitou byl též nechráněný pohlavní styk (PS), jak s nedostatečně známým a prověřeným sexuálním partnerem, tak pohlavní styk praktikovaný za úplatu. U významné části zařazených osob se rizika kombinovala.

Všichni zařazení pacienti podstoupili testování na přenosné choroby vyskytující se v rizikových populacích v ČR: virové hepatitidy typu A, B, C, HIV, a syfilis. Jednalo se o 29 mužů (58 %) a 21 žen (42 %). Věkový průměr celé skupiny 50 pacientů byl 30,34 roku (medián 29). Celkem 35 subjektů ze

studijní populace (70 %) uvedlo romskou etnicitu. Z 35 romských účastníků, bylo 17 mužů (48,6 %) a 18 (51,4 %) žen.

V rámci prezentované pilotní studie mělo 43 (86 %) z celkem 50 vyšetřených subjektů pozitivní antiHCV protilátky. Ze všech 35 osob z romské podskupiny bylo 32 (91,5 %) antiHCV pozitivních. Mezi všemi 43 antiHCV pozitivními pacienty bylo 35 (81,4 %) HCV RNA pozitivních, Romů bylo virologicky pozitivních 26 (81,3 %). V hodnoceném souboru nebyly u nikoho detekovány protilátky antiHIV 1, 2.

V 50 členné skupině jsme zachytili celkem 2 HBsAg pozitivní muže. Jeden HBsAg pozitivní pacient byl z romské podskupiny. Tento muž měl pozitivní také antiHCV protilátku i HCV RNA. Jako velmi významný vedlejší nález v rámci screeningu ve studii byl průkaz 9 případů luetické infekce. Všechna onemocnění byla v romské podskupině. Sérologické nálezy shrnuje tabulka 8.

Z celkového počtu 43 antiHCV pozitivních (z celé 50 členné skupiny) bylo virologicky vyšetřeno 42 vzorků, 35 bylo HCV RNA pozitivních (83,3 %). Negativních bylo 7 vzorků, jeden antiHCV pozitivní vzorek nebyl virologicky testován pro nedostatek materiálu na virologické vyšetření. Jiný genotyp než 1 nebo 3 se ve zkoumaném vzorku populace v Brně nevyskytoval. Také subtypové zastoupení bylo dle očekávání: 1a, 1b a 3a.

Zkušenost z průběhu studie ukazuje, že pacienti z romské komunity v Brně (stejně jako PWID v Praze a jejím okolí) jsou nakloněni ke spolupráci při léčebně preventivní péči, je-li zajištěno adekvátní proklientsky orientované prostředí, empatický personál a jsou respektována specifika této minority.

	anti HAV total	HBsAg	anti HBs	anti HBc	IgG	anti HCV	syfilis	HIV
všichni probandi	+	19	2	23	10	43	9	0
	-	23	39	17	22	7	36	44
	N/A	8	9	10	18	0	5	6
Romové	+	18	1	19	8	32	9	0
	-	11	28	8	12	3	23	30
	N/A	6	6	8	15	0	3	5

Tabulka 8 Sérologické nálezy infekčních chorob sledovaných v rámci pilotní studie (převzato z VĚCHETOVÁ, S., L. KREKULOVÁ, Z. OKTÁBEC a V. ŘEHÁK. Vysoká prevalence virové hepatitidy C ve vyloučené komunitě brněnských Romů. *Epidemiologie Mikrobiologie Imunologie*. 2019, **68**(3), 115-121³¹⁶).

Promořenost ve vyloučené komunitě brněnských Romů je podle pilotní studie velmi vysoká. Potvrdilo se, že jde o velmi ohroženou skupinu. Séroprevalence HCV 91,4 % je alarmující a blíží se číslům z nejrizikovějších světových regionů (Egypt, PWID ve vyloučených komunitách vyspělých zemí, apod.)^{317,318}. Pohybuje se na horní hranici literárně udávaných výsledků ve srovnatelných skupinách^{317,318} a významně převyšuje průměrnou odhadovanou séroprevalenci HCV v ČR¹⁵⁹ i naše vlastní výsledky z pražské komunity PWID¹⁶⁰. Je však obtížné pilotní výsledky srovnávat s dostupnými výstupy jiných prací z ČR. Z epidemiologického hlediska je velmi zajímavé vyšší zastoupení žen v pilotní studii, což v ostatních sledovaných PWID komunitách není obvyklé.

Je vhodné vyzdvihnout optimistické aspekty této práce. Z celkového počtu 26 HCV RNA pozitivních Romů, zahájili 4 (15,4 %) pacienti antivirotickou léčbu již ve sledovaném studijním období v roce 2017. V naší skupině do léčby již během popisovaného období nastoupil jeden muž s koinfekcí HBV a HCV a 3 ženy. Přestože se jednalo o malou pilotní skupinu, je 15 % klientů zařazených do virostatické léčby významně více, než je běžně udávaná „propustnost do léčby“ v zahraničních studiích^{294,319,320}.

10. Závěr

Habilitační práce mapuje dlouhodobý profesní zájem autorky během jejího medicínského curricula. Během tří dekád, které proběhly od objevu etiologického agens a popisu nového virového onemocnění, měla možnost zažít chvíle radosti i zklamání při diagnostice a zavádění virologických vyšetřovacích metod do běžné klinické praxe. Stanovila genotypové zastoupení v infikované populaci v ČR a v dalších letech sledovala a dokumentovala genotypový shift mezi PWID. Radovala se při zavedení pegylovaných interferonů do léčby chronických hepatitid. Z neléčitelné infekce se náhle stala nemoc, která měla řešení, ať již jakkoliv svízelné a pro pacienta i lékaře nesnadné. Sledovala pacienty při náročných léčbách interferonem a řešila s nimi stovky různých komplikací a nežádoucích účinků v důsledku těchto terapií. Spolu s nimi zažívala naději při virologické odpovědi během léčby a někdy také zklamání o rok později při relapsu po terapii. Program komplexní péče pro pacienty s komorbiditou závislosti, který spoluzakládala, otevřel cestu k diagnostice a léčbě HCV infekce stovkám PWID pacientů. Z mnoha pacientů se za roky nadějí a beznadějí stalo víc než jen anonymní diagnózy. Tím větší nadšení v profesionálním životě přinesla nová, zcela revoluční etapa v terapii chronické HCV infekce, dlouho očekávaná éra přímo působících virostatik. V léčbě virové hepatitidy typu C (VHC) přinesla úspěch, komfort, bezpečí a uzdravení.

Nová doba přináší i nová úskalí. Řada pacientů má stále mentálně propojenou léčbu HCV s tělesným a duševním utrpením a nechce slyšet, že již jsou v terapii nové možnosti a léčbu nebo opakovanou léčbu stále odmítá. Na druhé straně efektivita a jednoduchost, s jakou je pomocí DAA dosaženo eliminace HCV z organismu a údravy nemocného, vedou často u rizikově se chovajících osob k jisté lehkomyšlnosti a ztrátě obav z reinfekce. HCV infekci umíme vyléčit, ale neumíme přesvědčit pacienty, kterým je dobře a objektivně ještě nemají žádné příznaky závažného chronického onemocnění, aby změnili postoj ke svému zdraví a začali se testovat a léčit. Přenést nadšení, osvětu, diagnostiku a léčbu mezi sociálně izolované skupiny budoucích pacientů, kteří zatím nechtějí ve svých životech a zaběhnutých stereotypch nic měnit, představuje novou výzvu v souvislosti s léčbou a eradikací chronické HCV infekce.

11. Vybrané komentované publikace

1. KREKULOVA, Laura, Vratislav REHAK, Nora MADRIGAL, Matthew JOHNSON, Patrick KILLORAN a Lee W. RILEY. Genotypic and Epidemiologic Characteristics of Hepatitis C Virus Infections among Recent Injection Drug User and Nonuser Populations. *Clinical Infectious Diseases*. 2001, 33(8), 1435-1438. DOI: 10.1086/323199. ISSN 1058-4838. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/323199>.
2. KREKULOVA, L., V. REHAK, A. E. WAKIL, E. HARRIS a L. W. RILEY. Nested Restriction Site-Specific PCR To Detect and Type Hepatitis C Virus (HCV): a Rapid Method To Distinguish HCV Subtype 1b from Other Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, 39(5), 1774-1780. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1774-1780.2001. ISSN 0095-1137. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.39.5.1774-1780.2001>.
3. KREKULOVÁ, Laura, Vratislav ŘEHÁK a L.W. RILEY. Structure and functions of hepatitis C virus proteins, 15 years after. *Folia microbiologica*. 2006, 51(6), 665-680. ISSN 0015-5632. Dostupné také z: <http://www.biomed.cas.cz/mbu/fovia/>.
4. KREKULOVÁ, Laura, V. REHAK a L. W. RILEY. Hepatitis C virus (HCV) 5'NC sequence variants and their association with hepatitis C risk groups. *Journal of Clinical Virology*. 2005, 32(4), 300-304. ISSN 1386-6532. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S138665320400246X?via%3Dihub>.
5. KREKULOVÁ, Laura, Vratislav ŘEHÁK, Zbyněk OKTÁBEC and Jaroslav VACEK. HCV genotype shift occurred over the 15 years in PWIDs in the Czech Republic. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2019, 68(1), 3-8. ISSN 1210-7913. Available from: <https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2019-1-20/vyvoj-v-zastoupeni-genotypu-hcv-u-injekcnich-uzivatelu-drog-v-ceske-republice-behem-15-let-112615/download?hl=cs>.
6. VĚCHETOVÁ, Sonja, Laura KREKULOVÁ, Zbyněk OKTÁBEC a Vratislav ŘEHÁK. Vysoká prevalence virové hepatitidy C ve vyloučené komunitě brněnských Romů. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2019, 68(3), 115-121. ISSN 1210-7913. Dostupné také z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2019-3-23/vysoka-prevalence-virove-hepatitidy-c-ve-vyloucene-komunitě-brnenskyh-romu-119848>

12. Použitá literatura

- ¹ CHOO, Q., G KUO, A. WEINER, L. OVERBY, D. BRADLEY a M HOUGHTON. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989, **244**(4902), 359-362. DOI: 10.1126/science.2523562. ISSN 0036-8075. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2523562>
- ² CADIEUX, G. and H. SACHDEVA. Toward ending hepatitis C virus infection: What are the next steps?. *Canadian Medical Association Journal*. 2017, **189**(16), E583-E584. DOI: 10.1503/cmaj.170274. ISSN 0820-3946. Available from: <http://www.cmaj.ca/lookup/doi/10.1503/cmaj.170274>
- ³ COHEN, J. The Scientific Challenge of Hepatitis C. *Science*. **285**(5424), 26-30. DOI: 10.1126/science.285.5424.26. ISSN 00368075. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.285.5424.26>
- ⁴ Institute of Medicine. 2010. *Hepatitis and Liver Cancer: A National Strategy for Prevention and Control of Hepatitis B and C*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12793>. Available from: <http://www.nationalacademies.org/hmd/Reports/2010/Hepatitis-and-Liver-Cancer-A-National-Strategy-for-Prevention-and-Control-of-Hepatitis-B-and-C.aspx>
- ⁵ RAZAVI, H., S. ROBBINS, S. ZEUZEM, et al. *Hepatitis C virus prevalence and level of intervention required to achieve the WHO targets for elimination in the European Union by 2030: a modelling study*. 2017, **2**(5), 325-336. DOI: 10.1016/S2468-1253(17)30045-6. ISSN 24681253. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468125317300456>
- ⁶ Know your hepatitis status – increasing access to testing for a hidden infection. *World Health Organization* [online]. WHO, 2019 [cit. 2019-08-06]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/feature-stories/detail/know-your-hepatitis-status-increasing-access-to-testing-for-a-hidden-infection->
- ⁷ Nelson, P. K., B. M. Mathers, B. Cowie, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *The Lancet*, 2011, **378**(9791), 571-583. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61097-0. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673611610970>
- ⁸ Hepatitis C: Key facts. *World Health Organization* [online]. WHO, 2019, 9 July 2019 [cit. 2019-08-06]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
- ⁹ *Global Hepatitis Report, 2017*. Geneva: World Health Organization, 2017. ISBN 978-92-4-156545-5. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf?sequence=1>
- ¹⁰ Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2017, **2**, 161–176. DOI: [http://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30181-9](http://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30181-9). Available from: [http://www.thelancet.com/journals/langas/article/PIIS2468-1253\(16\)30181-9/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/langas/article/PIIS2468-1253(16)30181-9/fulltext)
- ¹¹ UNAIDS. Fact sheet - Latest statistics on the status of the AIDS epidemic. 2018. Available from: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf. Accessed 2 July 2019.
- ¹² Mitruka, K., T. Tsertsvadze, M. Butsashvili, et al. Launch of a Nationwide Hepatitis C Elimination Program--Georgia, April 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 2015, **64**(28), 753–757.
- ¹³ Bhamidimarri, K. R., S. K. Satapathy and P. Martin. Hepatitis C Virus and Liver Transplantation. *Gastroenterology & hepatology*, 2017, **13**(4), 214–220. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5441022/pdf/GH_13_214.pdf
- ¹⁴ CHOO, Q. L., K. H. RICHMAN, J. H. HAN, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991, **88**(6), 2451-2455. DOI: 10.1073/pnas.88.6.2451. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.88.6.2451>
- ¹⁵ BUKH, J., R. H. PURCELL and R. H. MILLER. Importance of primer selection for the detection of hepatitis C virus RNA with the polymerase chain reaction assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992, **89**(1), 187-191. DOI: 10.1073/pnas.89.1.187. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.1.187>
- ¹⁶ SMITH, D. B., J. MELLOR, L. M. JARVIS, F. DAVIDSON, J. KOLBERG, M. URDEA, P.-L. YAP and P. SIMMONDS. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *Journal of General Virology*. 1995, **76**(7), 1749-1761. DOI: 10.1099/0022-1317-76-7-1749. ISSN 0022-1317. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-76-7-1749>

-
- ¹⁷ Stites, D.P. : Basic & Clinical Immunology, Appleton & Lange, 1994
- ¹⁸ MAJOR, M. E., B. REHERMANN and S. M. FEINSTONE. Hepatitis C viruses. FIELDS, B. N., D. M. KNIPE, P. M. HOWLEY and D. E. GRIFFIN. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia, c2001, p. 1127-1161. ISBN 0781718325.
- ¹⁹ SPAHN, C. M. T. Hepatitis C Virus IRES RNA-Induced Changes in the Conformation of the 40S Ribosomal Subunit. *Science*. **291**(5510), 1959-1962. DOI: 10.1126/science.1058409. ISSN 00368075. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1058409>
- ²⁰ WANG, C., P. SARNOW a A. SIDDIQUI. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of Virology*. 1993, **67**(6), 3338-3344. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC237677/>
- ²¹ TSUKIYAMA-KOHARA, K., N. IIZUKA, M. KOHARA a A. NOMOTO. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology*. 1992, **66**(3), 1476-1483. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC240872/>
- ²² ZEIN, N. N., Jens BUKH, Carla KUIKEN, et al. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, **13**(2), 223-235. DOI: 10.1128/CMR.13.2.223-235.2000. ISSN 0893-8512. Available from: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.13.2.223-235.2000>
- ²³ BARTENSCHLAGER, R. and V. LOHMANN. Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*. 2000, **81**(7), 1631-1648. DOI: 10.1099/0022-1317-81-7-1631. ISSN 0022-1317. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-81-7-1631>
- ²⁴ HONDA, M., L.-H. PING, R. C.A. RIJNBRAND, E. AMPHLETT, B. CLARKE, D. ROWLANDS and S. M. LEMON. Structural Requirements for Initiation of Translation by Internal Ribosome Entry within Genome-Length Hepatitis C Virus RNA. *Virology*. 1996, **222**(1), 31-42. DOI: 10.1006/viro.1996.0395. ISSN 00426822. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682296903955>
- ²⁵ PESTOVA, T. V., I. N. SHATSKY, S. P. FLETCHER, R. J. JACKSON and C. U.T. HELLEN. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. 1998, **12**(1), 67-83. DOI: 10.1101/gad.12.1.67. ISSN 0890-9369. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.12.1.67>
- ²⁶ TANAKA, T., N. KATO, M. J. CHO a K. SHIMOTOHNO. A Novel Sequence Found at the 3'-Terminus of Hepatitis C Virus Genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995, **215**(2), 744-749. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2526. ISSN 0006291X. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X85725260>
- ²⁷ KOLYKHALOV, A. A., S. M. FEINSTONE a C. M. RICE. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of Virology*. 1996, **70**(6), 3363-3371. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC190207/pdf/703363.pdf>
- ²⁸ YI, M., S. M. LEMON. 3' Nontranslated RNA Signals Required for Replication of Hepatitis C Virus RNA. *Journal of Virology*. 2003, **77**(6), 3557-3568. DOI: 10.1128/JVI.77.6.3557-3568.2003. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.77.6.3557-3568.2003>
- ²⁹ LOHMANN V., F. KORNER, U. HERIAN and R. BARTENSCHLAGER. Biochemical properties of hepatitis C virus NSSB RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of Virology*. 1997, **71**(11), 8416-8428. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC192304/pdf/718416.pdf>
- ³⁰ KREKULOVÁ, Laura a Vratislav ŘEHÁK. *Virové hepatitidy: prevence, diagnostika a léčba*. Vyd. 2. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-725-4218-4.
- ³¹ KATO, N., M. HIJIKATA, Y. OOTSUYAMA, M. NAKAGAWA, S. OHKOSHI, T. SUGIMURA and K. SHIMOTOHNO. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990, **87**(24), 9524-9528. DOI: 10.1073/pnas.87.24.9524. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.87.24.9524>
- ³² LO, S.-Y., F. MASIARZ, S. B. HWANG, M. M.C. LAI a J.-H. OU. Differential Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Core Gene Products. *Virology*. 1995, **213**(2), 455-461. DOI: 10.1006/viro.1995.0018. ISSN 00426822. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682285700189>
- ³³ XU, Z., J. CHOI, T.S. B. YEN, et al. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *The EMBO Journal*. **20**(14), 3840-3848. DOI: 10.1093/emboj/20.14.3840. ISSN 14602075. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/20.14.3840>
- ³⁴ CHANG, J., S. H. YANG, Y. G. CHO, S. B. HWANG, Y. S. HAHN and Y. C. SUNG. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo

- fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *Journal of virology*. 1998, **72**(4), 3060–3065. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109754/pdf/jv003060.pdf>
- ³⁵ BUKH, J., R. H. PURCELL and R. H. MILLER. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994, **91**(17), 8239-8243. DOI: 10.1073/pnas.91.17.8239. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.17.8239>
- ³⁶ MCLAUCHLAN, J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *Journal of Viral Hepatitis*. 2000, **7**(1), 2-14. DOI: 10.1046/j.1365-2893.2000.00201.x. ISSN 13520504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2893.2000.00201.x>
- ³⁷ LERAT, H., M. HONDA, M. R. BEARD, et al. Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Gastroenterology*. 2002, **122**(2), 352-365. DOI: 10.1053/gast.2002.31001. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508502734689>
- ³⁸ MAJEAU, N., R. FROMENTIN, C. SAVARD, M. DUVAL, M. J. TREMBLAY and D. LECLERC. Palmitoylation of Hepatitis C Virus Core Protein Is Important for Virion Production. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, **284**(49), 33915-33925. DOI: 10.1074/jbc.M109.018549. ISSN 0021-9258. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M109.018549>
- ³⁹ JONES, D. M., A. M. ATOOM, X. ZHANG, S. KOTILIL and R. S. RUSSELL. A Genetic Interaction between the Core and NS3 Proteins of Hepatitis C Virus Is Essential for Production of Infectious Virus. *Journal of Virology*. 2011, **85**(23), 12351-12361. DOI: 10.1128/JVI.05313-11. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.05313-11>
- ⁴⁰ FOKA, P., A. DIMITRIADIS, E. KYRATZOPOULOU, D. A. GIANNIMARAS, S. SARNO, G. SIMOS, U. GEORGOPOULOU and A. MAMALAKI. A complex signaling network involving protein kinase CK2 is required for hepatitis C virus core protein-mediated modulation of the iron-regulatory hepcidin gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014, **71**(21), 4243-4258. DOI: 10.1007/s00018-014-1621-4. ISSN 1420-682X. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-014-1621-4>
- ⁴¹ PAZIENZA, V., S. CLÉMENT, P. PUGNALE, S. CONZELMAN, M. FOTI, A. MANGIA and F. NEGRO. The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms. *Hepatology*. 2007, **45**(5), 1164-1171. DOI: 10.1002/hep.21634. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.21634>
- ⁴² PERSICO, M., M. CAPASSO, E. PERSICO, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) expression and hepatitis C virus-related chronic hepatitis: Insulin resistance and response to antiviral therapy. *Hepatology*. 2007, **46**(4), 1009-1015. DOI: 10.1002/hep.21782. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.21782>
- ⁴³ BARBA, G., F. HARPER, T. HARADA, et al. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, **94**(4), 1200-1205. DOI: 10.1073/pnas.94.4.1200. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.94.4.1200>
- ⁴⁴ KIM, S., T. DATE, H. YOKOKAWA, T. KONO, H. AIZAKI, P. MAUREL, C. GONDEAU and T. WAKITA. Development of hepatitis C virus genotype 3a cell culture system. *Hepatology*. 2014, **60**(6), 1838-1850. DOI: 10.1002/hep.27197. ISSN 0270-9139. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.27197>
- ⁴⁵ ABID, K., V. PAZIENZA, A. DE GOTTARDI, et al. An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation. *Journal of Hepatology*. 2005, **42**(5), 744-751. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.12.034. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827805000747>
- ⁴⁶ FLINT, M., J. M. Thomas, C. M. Maidens, C. Shotton, S. Levy, W. S. Barclay and J. A. McKeating. Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of virology*. 1999, **73**(8), 6782–6790. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC112763/>
- ⁴⁷ PILERI, P., Y. UEMATSU, S. CAMPAGNOLI, et al. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science*. **282**(5390), 938-941. DOI: 10.1126/science.282.5390.938. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.282.5390.938>
- ⁴⁸ HSU, M., J. ZHANG, M. FLINT, C. LOGVINOFF, C. CHENG-MAYER, C. M. RICE and J. A. MCKEATING. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, **100**(12), 7271-7276. DOI: 10.1073/pnas.0832180100. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0832180100>

- ⁴⁹ BOULESTIN, Anne, Karine SANDRES-SAUNÉ, Jean-Louis PAYEN, et al. Genetic heterogeneity of the envelope 2 gene and eradication of hepatitis C virus after a second course of interferon- α . *Journal of Medical Virology*. 2002, **68**(2), 221-228. DOI: 10.1002/jmv.10192. ISSN 01466615. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.10192>
- ⁵⁰ PAWLLOTSKY, Jean-Michel. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clinics in Liver Disease*. 2003, 7(1), 45-66. DOI: 10.1016/S1089-3261(02)00065-X. ISSN 10893261. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S108932610200065X>
- ⁵¹ GRIFFIN, Stephen D.C., Lucy P. BEALES, Dean S. CLARKE, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Letters*. 2003, **535**(1-3), 34-38. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)03851-6. ISSN 00145793. Available from: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(02\)03851-6](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(02)03851-6)
- ⁵² STEINMANN, E., F. PENIN, S. KALLIS, A. H. PATEL, R. BARTENSCHLAGER a T. PIETSCHMANN. Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. *PLoS Pathogens*. 2007, **3**(7), 07-PLPA-RA-0033. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030103. ISSN 1553-7366. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0030103>
- ⁵³ STGELAIS, C., T. L. FOSTER, M. VEROW, et al. Determinants of Hepatitis C Virus p7 Ion Channel Function and Drug Sensitivity Identified In Vitro. *Journal of Virology*. 2009, **83**(16), 7970-7981. DOI: 10.1128/JVI.00521-09. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00521-09>
- ⁵⁴ SUZUKI, R., M. MATSUDA, K. WATASHI, H. AIZAKI, Y. MATSUURA, T. WAKITA, T. SUZUKI and A. SIDDIQUI. Signal Peptidase Complex Subunit 1 Participates in the Assembly of Hepatitis C Virus through an Interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathogens*. 2013, **9**(8). DOI: 10.1371/journal.ppat.1003589. ISSN 1553-7374. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003589>
- ⁵⁵ GRAKOU, A., D. W. MCCOURT, C. WYCHOWSKI, S. M. FEINSTONE a C. M. RICE. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993, **90**(22), 10583-10587. DOI: 10.1073/pnas.90.22.10583. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.90.22.10583>
- ⁵⁶ HIJIKATA, M., H. MIZUSHIMA, T. AKAGI, et al. Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *Journal of virology*. 1993, **67**(8), 4665-4675. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC237852/pdf/jvirol00029-0221.pdf>
- ⁵⁷ REED, K. E., A. GRAKOU and C. M. RICE. Hepatitis C virus-encoded NS2-3 protease: cleavage-site mutagenesis and requirements for bimolecular cleavage. *Journal of Virology*. 1995, **69**(7), 4127-4136. Available from: <https://jvi.asm.org/content/69/7/4127.long>
- ⁵⁸ LORENZ, I. C., J. MARCOTRIGIANO, T. G. DENTZER and C. M. RICE. Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature*. 2006, **442**(7104), 831-835. DOI: 10.1038/nature04975. ISSN 0028-0836. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature04975>
- ⁵⁹ KIM, D. W., Y. GWACK, J. H. HAN and J. CHOE. C-Terminal Domain of the Hepatitis C Virus NS3 Protein Contains an RNA Helicase Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995, **215**(1), 160-166. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2447. ISSN 0006291X. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X85724473>
- ⁶⁰ GALLINARI, P., D. BRENNAN, C. NARDI, M. BRUNETTI, L. TOMEI, C. STEINKÜHLER and R. DE FRANCESCO. Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus. *Journal of virology*. 1998, **72**(8), 6758-6769. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109884/pdf/jv006758.pdf>
- ⁶¹ BARTENSCHLAGER, R., L. AHLBORN-LAAKE, J. MOUS and H. JACOBSEN, H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *Journal of Virology*. 1994, **68**(8), 5045-5055. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC236447/pdf/jvirol00017-0351.pdf>
- ⁶² GRAKOU, A., D. W. MCCOURT, C., WYCHOWSKI, S. M. FEINSTONE and C. M. RICE. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *Journal of virology*. 1993, **67**(5), 2832-2843. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC237608/pdf/jvirol00026-0416.pdf>
- ⁶³ TAI, C. L., W. K. CHI, D. S. CHEN and L. H. HWANG. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *Journal of Virology*. 1996, **70**(12), 8477-8484. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC190938/pdf/708477.pdf>
- ⁶⁴ GALE, M. and E. M. FOY. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*. 2005, **436**(7053), 939-945. DOI: 10.1038/nature04078. ISSN 0028-0836. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature04078>

- ⁶⁵ SEREBROV, V. and A. M. PYLE. Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature*. 2004, **430**(6998), 476-480. DOI: 10.1038/nature02704. ISSN 0028-0836. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature02704>
- ⁶⁶ LEVIN, M. K., M. GURJAR and S. S. PATEL. A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase. *Nature structural & molecular biology*. 2005, **12**(5), 429-435. DOI: 10.1038/nsmb920. ISSN 1545-9993. Available from: <http://www.nature.com/articles/nsmb920>
- ⁶⁷ DE FRANCESCO, R., A. PESSI and C. STEINKUHLER. Mechanisms of hepatitis C virus NS3 proteinase inhibitors. *Journal of Viral Hepatitis*. 1999, **6**(s1), 23-30. DOI: 10.1046/j.1365-2893.1999.00002.x. ISSN 1352-0504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2893.1999.00002.x>
- ⁶⁸ DE FRANCESCO, R., L. TOMEI, S. ALTAMURA, V. SUMMA and G. MIGLIACCIO. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Research*. 2003, **58**(1), 1-16. DOI: 10.1016/S0166-3542(03)00028-7. ISSN 01663542. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354203000287>
- ⁶⁹ INGALLINELLA, P., S. ALTAMURA, E. BIANCHI, et al. Potent Peptide Inhibitors of Human Hepatitis C Virus NS3 Protease Are Obtained by Optimizing the Cleavage Products. *Biochemistry*. 1998, **37**(25), 8906-8914. DOI: 10.1021/bi980314n. ISSN 0006-2960. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi980314n>
- ⁷⁰ SAALAU-BETHELL, S. M, A. J. WOODHEAD, G. CHESSARI, et al. Discovery of an allosteric mechanism for the regulation of HCV NS3 protein function. *Nature Chemical Biology*. 2012, **8**(11), 920-925. DOI: 10.1038/nchembio.1081. ISSN 1552-4450. Available from: <http://www.nature.com/articles/nchembio.1081>
- ⁷¹ KIM, J. L., K. A. MORGENSTERN, C. LIN, et al. Crystal Structure of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Domain Complexed with a Synthetic NS4A Cofactor Peptide. *Cell*. 1996, **87**(2), 343-355. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81351-3. ISSN 00928674. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400813513>
- ⁷² TOMEI, L., C. FAILLA, R. L. VITALE, E. BIANCHI and R. DE FRANCESCO. A central hydrophobic domain of the hepatitis C virus NS4A protein is necessary and sufficient for the activation of the NS3 protease. *Journal of General Virology*. 1996, **77**(5), 1065-1070. DOI: 10.1099/0022-1317-77-5-1065. ISSN 0022-1317. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-77-5-1065>
- ⁷³ ASABE, S. I., Y. TANJI, S. SATOH, T. KANEKO, K. KIMURA and K. SHIMOTOHNO. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *Journal of Virology*. 1997, **71**(1), 790-796. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC191119/pdf/710790.pdf>
- ⁷⁴ LIN, C., J. W. WU, K. HSIAO and M. S. SU. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *Journal of Virology*. 1997, **71**(9), 6465-6471. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC191920/pdf/716465.pdf>
- ⁷⁵ EGGER, D., B. WOLK, R. GOSERT, L. BIANCHI, H. E. BLUM, D. MORADPOUR and K. BIENZ. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology*. 2002, **76**(12), 5974-5984. DOI: 10.1128/JVI.76.12.5974-5984.2002. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.76.12.5974-5984.2002>
- ⁷⁶ HAN, Q., D. MANNA, K. BELTON, R. COLE and K. V. KONAN. Modulation of Hepatitis C Virus Genome Encapsidation by Nonstructural Protein 4B. *Journal of Virology*. 2013, **87**(13), 7409-7422. DOI: 10.1128/JVI.03523-12. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.03523-12>
- ⁷⁷ HAN, Q., J. ALIGO, D. MANNA, et al. Conserved GXXXG- and S/T-Like Motifs in the Transmembrane Domains of NS4B Protein Are Required for Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Virology*. 2011, **85**(13), 6464-6479. DOI: 10.1128/JVI.02298-10. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02298-10>
- ⁷⁸ BRASS, V., E. BIECK, R. MONTSERRET, B. WÖLK, J. A. HELTINGS, H. E. BLUM, F. PENIN and D. MORADPOUR. An Amino-terminal Amphipathic α -Helix Mediates Membrane Association of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(10), 8130-8139. DOI: 10.1074/jbc.M111289200. ISSN 0021-9258. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111289200>
- ⁷⁹ PENIN, F., V. BRASS, N. APPEL, et al. Structure and Function of the Membrane Anchor Domain of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, **279**(39), 40835-40843. DOI: 10.1074/jbc.M404761200. ISSN 0021-9258. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M404761200>
- ⁸⁰ ELAZAR, M., K. H. CHEONG, P. LIU, H. B. GREENBERG, C. M. RICE and J. S. GLENN. Amphipathic Helix-Dependent Localization of NS5A Mediates Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology*. 2003, **77**(10), 6055-6061. DOI: 10.1128/JVI.77.10.6055-6061.2003. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.77.10.6055-6061.2003>

- ⁸¹ TANJI, Y., T. KANEKO, S. SATOH and K. SHIMOTOHNO. Phosphorylation of hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS5A. *Journal of virology*. 1995, **69**(7), 3980–3986. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC189129/pdf/693980.pdf>
- ⁸² REED, K. E. and C. M. RICE. Identification of the Major Phosphorylation Site of the Hepatitis C Virus H Strain NS5A Protein as Serine 2321. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, **274**(39), 28011-28018. DOI: 10.1074/jbc.274.39.28011. ISSN 0021-9258. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.274.39.28011>
- ⁸³ TAN, S.-L. and M. G. KATZE. How Hepatitis C Virus Counteracts the Interferon Response: The Jury Is Still out on NS5A. *Virology*. 2001, **284**(1), 1-12. DOI: 10.1006/viro.2001.0885. ISSN 00426822. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682201908852>
- ⁸⁴ GALE, M. J., M. J. KORTH, N. M. TANG, et al. Evidence That Hepatitis C Virus Resistance to Interferon Is Mediated through Repression of the PKR Protein Kinase by the Nonstructural 5A Protein. *Virology*. 1997, **230**(2), 217-227. DOI: 10.1006/viro.1997.8493. ISSN 00426822. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682297984932>
- ⁸⁵ ENOMOTO, N., I. SAKUMA, Y. ASAHINA, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *Journal of Clinical Investigation*. 1995, **96**(1), 224-230. DOI: 10.1172/JCI118025. ISSN 0021-9738. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/118025>
- ⁸⁶ SCHIAPPA, D. A., C. MITTAL, J. A. BROWN and B. P. MIKA. Relationship of Hepatitis C Genotype 1 NS5A Sequence Mutations to Early Phase Viral Kinetics and Interferon Effectiveness. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002, **185**(7), 868-877. DOI: 10.1086/339485. ISSN 0022-1899. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/339485>
- ⁸⁷ MACDONALD, A., K. CROWDER, A. STREET, C. MCCORMICK and M. HARRIS. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *Journal of General Virology*. 2004, **85**(3), 721-729. DOI: 10.1099/vir.0.19691-0. ISSN 0022-1317. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.19691-0>
- ⁸⁸ LIM, P. J., U. CHATTERJI, D. CORDEK, et al. Correlation between NS5A Dimerization and Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, **287**(36), 30861-30873. DOI: 10.1074/jbc.M112.376822. ISSN 0021-9258. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.376822>
- ⁸⁹ TELLINGHUISEN, T. L., K. L. FOSS, J. TREADAWAY and A. GARCIA-SASTRE. Regulation of Hepatitis C Virion Production via Phosphorylation of the NS5A Protein. *PLoS Pathogens*. 2008, **4**(3). DOI: 10.1371/journal.ppat.1000032. ISSN 1553-7374. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000032>
- ⁹⁰ BRESSANELLI, S., L. TOMEI, F. A. REY and R. DE FRANCESCO. Structural Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Complex with Ribonucleotides. *Journal of Virology*. 2002, **76**(7), 3482-3492. DOI: 10.1128/JVI.76.7.3482-3492.2002. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.76.7.3482-3492.2002>
- ⁹¹ FERRARI, E., J. WRIGHT-MINOGUE, J. W. FANG, B. M. BAROUDY, J. Y. LAU and Z. HONG. Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli. *Journal of virology*. 1999, **73**(2), 1649–1654. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC103993/pdf/jv001649.pdf>
- ⁹² LUO, G., R. K. HAMATAKE, D. M. MATHIS, J. RACELA, K. L. RIGAT, J. LEMM and R. J. COLONNO. De Novo Initiation of RNA Synthesis by the RNA-Dependent RNA Polymerase (NS5B) of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*. 2000, **74**(2), 851-863. DOI: 10.1128/JVI.74.2.851-863.2000. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.74.2.851-863.2000>
- ⁹³ SESMERO, E. and I. THORPE. Using the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase as a Model to Understand Viral Polymerase Structure, Function and Dynamics. *Viruses*. 2015, **7**(7), 3974-3994. DOI: 10.3390/v7072808. ISSN 1999-4915. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/7/7/2808>
- ⁹⁴ HELLE, F. and J. DUBUISSON. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008, **65**(1), 100-112. DOI: 10.1007/s00018-007-7291-8. ISSN 1420-682X. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-007-7291-8>
- ⁹⁵ BARTH, H., T. J. LIANG and T. F. BAUMERT. Hepatitis C virus entry: Molecular biology and clinical implications. *Hepatology*. 2006, **44**(3), 527-535. DOI: 10.1002/hep.21321. ISSN 0270-9139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.21321>
- ⁹⁶ GOFF, S. P. Retrovirus Restriction Factors. *Molecular Cell*. 2004, **16**(6), 849-859. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.12.001. ISSN 10972765. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276504007555>

- ⁹⁷ LUBAN, J. Cyclophilin A, TRIM5, and Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of Virology*. 2007, **81**(3), 1054-1061. DOI: 10.1128/JVI.01519-06. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01519-06>
- ⁹⁸ ROCHA-PERUGINI, V., C. MONTPELLIER, D. DELGRANGE, et al. The CD81 Partner EWI-2wint Inhibits Hepatitis C Virus Entry. *PLoS ONE*. 2008, **3**(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0001866. ISSN 1932-6203. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0001866>
- ⁹⁹ EL-HAGE, N. and G. LUO. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *Journal of General Virology*. 2003, **84**(10), 2761-2769. DOI: 10.1099/vir.0.19305-0. ISSN 0022-1317. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.19305-0>
- ¹⁰⁰ GOSERT, R., D. EGGER, V. LOHMANN, R. BARTENSCHLAGER, H. E. BLUM, K. BIENZ and D. MORADPOUR. Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *Journal of Virology*. 2003, **77**(9), 5487-5492. DOI: 10.1128/JVI.77.9.5487-5492.2003. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.77.9.5487-5492.2003>
- ¹⁰¹ GREMION, C. and A. CERNY. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Reviews in Medical Virology*. 2005, **15**(4), 235-268. DOI: 10.1002/rmv.466. ISSN 1052-9276. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.466>
- ¹⁰² THOMSON, M., M. NASCIMBENI, M. B. HAVERT, et al. The Clearance of Hepatitis C Virus Infection in Chimpanzees May Not Necessarily Correlate with the Appearance of Acquired Immunity. *Journal of Virology*. 2003, **77**(2), 862-870. DOI: 10.1128/JVI.77.2.862-870.2003. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.77.2.862-870.2003>
- ¹⁰³ ASHFAQ, U. A., T. JAVED, S. REHMAN, Z. NAWAZ and S. RIAZUDDIN. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology Journal*. 2011, **8**(1). DOI: 10.1186/1743-422X-8-161. ISSN 1743-422X. Available from: <https://virology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-161>
- ¹⁰⁴ ALEXOPOULOU, L., A. C. HOLT, R. MEDZHITOV and R. A. FLAVELL. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001, **413**(6857), 732-738. DOI: 10.1038/35099560. ISSN 0028-0836. Available from: <http://www.nature.com/articles/35099560>
- ¹⁰⁵ MULLER, U., U. STEINHOFF, L. REIS, S. HEMMI, J. PAVLOVIC, R. ZINKERNAGEL and M. AGUET. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*. 1994, **264**(5167), 1918-1921. DOI: 10.1126/science.8009221. ISSN 0036-8075. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.8009221>
- ¹⁰⁶ ŘEHÁK V., L. KREKULOVÁ. Pegylované interferony – budoucí standard v léčbě chronických virových hepatitid. *Trendy v medicíně – zvláštní vydání*. 1998, **4**, 1-20. ISSN: 1212-9046.
- ¹⁰⁷ CHA, T. A., E. BEALL, B. IRVINE, J. KOLBERG, D. CHIEN, G. KUO and M. S. URDEA. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992, **89**(15), 7144-7148. DOI: 10.1073/pnas.89.15.7144. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.15.7144>
- ¹⁰⁸ CHAN, S.-W., F. McOMISH, E. C. HOLMES, B. DOW, J. F. PEUTHERER, E. FOLLETT, P. L. YAP and P. SIMMONDS. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *Journal of General Virology*. 1992, **73**(5), 1131-1141. DOI: 10.1099/0022-1317-73-5-1131. ISSN 0022-1317. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-73-5-1131>
- ¹⁰⁹ POLYAK, S. J., S. MCARDLE, S. L. LIU, et al. Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *Journal of Virology*. 1998, **72**(5), 4288-4296. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109659/>
- ¹¹⁰ POWER, J. P., E. LAWLOR, F. DAVIDSON, E. C. HOLMES, P. L. YAP and P. SIMMONDS. Molecular epidemiology of an outbreak of infection with hepatitis C virus in recipients of anti-D immunoglobulin. *The Lancet*. 1995, **345**(8959), 1211-1213. DOI: 10.1016/S0140-6736(95)91993-7. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673695919937>
- ¹¹¹ POWER, J. P., E. LAWLOR, F. DAVIDSON, P. L. YAP, E. KENNY-WALSH, M. J. WHELTON and T. J. WALSH. Hepatitis C viraemia in recipients of Irish intravenous anti-D immunoglobulin. *The Lancet*. 1994, **344**(8930), 1166-1167. DOI: 10.1016/S0140-6736(94)90679-3. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673694906793>
- ¹¹² MELLOR, J., E. C. HOLMES, L. M. JARVIS, P. L. YAP and P. SIMMONDS. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *Journal of General Virology*. 1995, **76**(10), 2493-2507. DOI: 10.1099/0022-1317-76-10-2493. ISSN 0022-1317. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-76-10-2493>

- ¹¹³ SIMMONDS, P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*. 1999, **31**, 54-60. DOI: 10.1016/S0168-8278(99)80375-4. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827899803754>
- ¹¹⁴ SIMMONDS, P., E. C. HOLMES, T. A. CHA, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology*. 1993, **74**(11), 2391-2399. DOI: 10.1099/0022-1317-74-11-2391. ISSN 0022-1317. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-74-11-2391>
- ¹¹⁵ OKAMOTO, H., S. KOBATA, H. TOKITA, et al. A second-generation method of genotyping hepatitis C virus by the polymerase chain reaction with sense and antisense primers deduced from the core gene. *Journal of Virological Methods*. 1996, **57**(1), 31-45. DOI: 10.1016/0166-0934(95)01960-X. ISSN 01660934. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016609349501960X>
- ¹¹⁶ OKAMOTO, H., Y. SUGIYAMA, S. OKADA, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *Journal of General Virology*. 1992, **73**(3), 673-679. DOI: 10.1099/0022-1317-73-3-673. ISSN 0022-1317. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-73-3-673>
- ¹¹⁷ SIMMONDS, P., F. MCOMISH, P. L. YAP, S.-W. CHAN, C. K. LIN, G. DUSHEIKO, A. A. SAEED and E. C. HOLMES. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *Journal of General Virology*. 1993, **74**(4), 661-668. DOI: 10.1099/0022-1317-74-4-661. ISSN 0022-1317. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-74-4-661>
- ¹¹⁸ SIMMONDS, P., A. ALBERTI, H. J. ALTER, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. 1994, **19**(5), 1321-1324. DOI: 10.1002/hep.1840190538. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.1840190538>
- ¹¹⁹ MORI, Shigehisa, N. KATO, A. YAGYU, et al. A new type of hepatitis C virus in patients in Thailand. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1992, **183**(1), 334-342. DOI: 10.1016/0006-291X(92)91648-A. ISSN 0006291X. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X9291648A>
- ¹²⁰ SIMMONDS, P., J. BUKH, C. COMBET, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005, **42**(4), 962-973. DOI: 10.1002/hep.20819. ISSN 0270-9139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20819>
- ¹²¹ SMITH, D. B., J. BUKH, C. KUIKEN, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014, **59**(1), 318-327. DOI: 10.1002/hep.26744. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26744>
- ¹²² TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI and S. KUMAR. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011, **28**(10), 2731-2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121. ISSN 0737-4038. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msr121>
- ¹²³ ALTER, M. J. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*. 2002, **36**(5B), s93-s98. DOI: 10.1053/jhep.2002.36389. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1053/jhep.2002.36389>
- ¹²⁴ ESTEBAN, J. I., S. SAULEDA and J. QUER. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of Hepatology*. 2008, **48**(1), 148-162. DOI: 10.1016/j.jhep.2007.07.033. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827807005739>
- ¹²⁵ WHO, Global database on blood safety, 2004-2005 and GDBS 2008. [cit. 13-06-2019] Available from: https://www.who.int/bloodsafety/global_database/GDBSReport2004-2005.pdf.
- ¹²⁶ ALTER, H. J. and M. HOUGHTON. Clinical Medical Research Award. Hepatitis C Virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nature Medicine*. 2000, **6**(10), 1082-1086. DOI: 10.1038/80394. ISSN 1078-8956. Available from: http://www.nature.com/articles/nm1000_1082
- ¹²⁷ LIM, J. K., S. L. FLAMM, S. SINGH, et al. American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Role of Elastography in the Evaluation of Liver Fibrosis. *Gastroenterology* [online]. 2017, **152**(6), 1536-1543. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.03.017. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508517303268>
- ¹²⁸ WHO. Global surveillance and control of hepatitis C: Report of WHO consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *Journal of Viral Hepatitis*. 1999, **6**(1), 35-47. DOI: 10.1046/j.1365-2893.1999.6120139.x. ISSN 1352-0504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2893.1999.6120139.x>
- ¹²⁹ *Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection, April 2014*. Geneva: World Health Organization, 2014. ISBN 978-92-4-154875-5. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/111747/9789241548755_eng.pdf?sequence=1

- ¹³⁰ BRUGGMANN, P., T. BERG, A. L. H. ØVREHUS, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *Journal of Viral Hepatitis*. 2014, **21**(Suppl. 1), 5-33. DOI: 10.1111/jvh.12247. ISSN 13520504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12247>
- ¹³¹ SARASWAT, V., S. NORRIS, R. J. DE KNEGT, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in select countries - volume 2. *Journal of Viral Hepatitis*. 2015, **22** (Suppl. 1), 6-25. DOI: 10.1111/jvh.12350. ISSN 13520504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12350>
- ¹³² LIAKINA, V., S. HAMID, J. TANAKA, et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in select countries - volume 3. *Journal of Viral Hepatitis*. 2015, **22**(Suppl. 4), 4-20. DOI: 10.1111/jvh.12475. ISSN 13520504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12475>
- ¹³³ BUCKLEY, Gillian J. a Brian L. STROM. Eliminating the public health problem of hepatitis B and C in the United States: phase one report. Washington, DC: the National Academies Press, [2016]. ISBN 03-094-3799-7.
- ¹³⁴ ZIBELL, J. E., IGBAL, K. and R. C. PATEL. Increases in hepatitis C virus infection related to injection drug use among persons aged ≤30 years - Kentucky, Tennessee, Virginia, and West Virginia, 2006-2012. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 2015, **64**(17), 453-458.
- ¹³⁵ SURYAPRASAD, A. G., J. Z. WHITE, F. XU, et al. Emerging Epidemic of Hepatitis C Virus Infections Among Young Nonurban Persons Who Inject Drugs in the United States, 2006–2012. *Clinical Infectious Diseases*. 2014, **59**(10), 1411-1419. DOI: 10.1093/cid/ciu643. ISSN 1058-4838. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciu643>
- ¹³⁶ Guidelines for the screening care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection. Updated version, April 2016. Geneva: World Health Organization, 2016. ISBN 978-92-4-154961-5. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205035/9789241549615_eng.pdf?sequence=1
- ¹³⁷ STANAWAY, Jeffrey D, Abraham D FLAXMAN, Mohsen NAGHAVI, et al. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2016, **388**(10049). DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30579-7. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616305797>
- ¹³⁸ RAZAVI, Homie, Antoine C. ELKHOORY, Elamin ELBASHA, Chris ESTES, Ken PASINI, Thierry POYNARD a Ritesh KUMAR. Chronic hepatitis C virus (HCV) disease burden and cost in the United States. *Hepatology*. 2013, **57**(6), 2164-2170. DOI: 10.1002/hep.26218. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26218>
- ¹³⁹ MCCAWE, R., L. MOAVEN, S. A. LOCARNINI and D. S. BOWDEN. Hepatitis C virus genotypes in Australia. *Journal of Viral Hepatitis*. 1997, **4**(5), 351-357. DOI: 10.1046/j.1365-2893.1997.00060.x. ISSN 1352-0504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2893.1997.00060.x>
- ¹⁴⁰ MCOMISH, F., P. L. YAP, B. C. DOW, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *Journal of clinical microbiology*, 1994, **32**(4), 884–892. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC263157/pdf/jcm00004-0040.pdf>
- ¹⁴¹ MELLOR, J., E. C. HOLMES, L. M. JARVIS, P. L. YAP and P. SIMMONDS. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *Journal of General Virology*. 1995, **76**(10), 2493-2507. DOI: 10.1099/0022-1317-76-10-2493. ISSN 0022-1317. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-76-10-2493>
- ¹⁴² MANSELL, C. and S. LOCARNINI. Epidemiology of Hepatitis C in the East. *Seminars in Liver Disease*. 1995, **15**(01), 15-32. DOI: 10.1055/s-2007-1007260. ISSN 0272-8087. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-1007260>
- ¹⁴³ PISTELLO, M., F. MAGGI, L. VATTERONI, et al. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Italy. *Journal of clinical microbiology*, 1994, **32**(1), 232–234. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC263005/pdf/jcm00001-0254.pdf>
- ¹⁴⁴ SEME, K., M. POLJAK, G. LEŠNIČAR, V. BRINOVEC, S. ŠTEPEC and S. KOREN. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Slovenia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 1997, **29**(1), 29-31.
- ¹⁴⁵ SIMMONDS, P., J. MELLOR, A. CRAXI, et al. Epidemiological, clinical and therapeutic associations of hepatitis C types in western European patients. *Journal of Hepatology*. 1996, **24**(5), 517-524. DOI: 10.1016/S0168-8278(96)80135-8. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827896801358>
- ¹⁴⁶ CROFTS, N., J. L. HOPPER, R. MILNER, A. M. BRESCHKIN, D. S. BOWDEN and S. A. LOCARNINI. Blood-borne virus infections among Australian injecting drug users: Implications for spread of HIV. *European Journal of Epidemiology*. 1994, **10**(6), 687-694. DOI: 10.1007/BF01719282. ISSN 0392-2990. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01719282>
- ¹⁴⁷ MOAVEN, L. D., N. CROFTS, R. MCCAWE and D. S. BOWDEN. The changing prevalence of hepatitis C virus types in injecting drug users between 1971 and 1994 (letter). *The Medical Journal of Australia*. 1996, **165**(4), 233.

- ¹⁴⁸ ROSEN, H. R., S. CHOU, A. W. SASAKI and D. R. GRETCH. Molecular Epidemiology of Hepatitis C Infection in U.S. Veteran Liver Transplant Recipients: Evidence for Decreasing Relative Prevalence of Genotype 1B. *American Journal of Gastroenterology*. 1999, **94**(10), 3015-3019. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.01456.x. ISSN 0002-9270. Available from: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00000434-199910000-00047>
- ¹⁴⁹ ABDULKARIM, A. S., K. L. KRAJNIK, M. TOUROGMAN, et al. Hepatitis C virus genotypes and hepatitis G virus in hemodialysis patients from Syria: identification of two novel hepatitis C virus subtypes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998, **59**(4), 571-576. DOI: 10.4269/ajtmh.1998.59.571. ISSN 0002-9637. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1998.59.571>
- ¹⁵⁰ MAHANEY, K., V. TEDESCHI, G. MAERTENS, A. M. DI BISCEGLIE, J. VERGALLA, J. H. HOOFNAGLE and R. SALLIE. Genotypic analysis of hepatitis C virus in American patients. *Hepatology*. 1994, **20**(6), 1405-1411. DOI: 10.1002/hep.1840200605. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.1840200605>
- ¹⁵¹ TAKADA, N., S. TAKASE, A. TAKADA and T. DATE. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *Journal of Hepatology*. 1993, **17**(3), 277-283. DOI: 10.1016/S0168-8278(05)80205-3. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827805802053>
- ¹⁵² ZEIN, N. N., J. RAKELA, J. J. POTERUCHA, J. L. STEERS, R. H. WIESNER and D. H. PERSING. Hepatitis C genotypes in liver transplant recipients: Distribution and 1-year follow-up. *Liver Transplantation and Surgery*. 1995, **1**(6), 354-357. DOI: 10.1002/lt.500010603. ISSN 10743022. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lt.500010603>
- ¹⁵³ PAWLOTSKY, J.-M., L. TSAKIRIS, F. ROUDOT-THORAVAL, C. PELLET, L. STUYVER, J. DUVAL and D. DHUMEAUX. Relationship between Hepatitis C Virus Genotypes and Sources of Infection in Patients with Chronic Hepatitis C. *Journal of Infectious Diseases*. 1995, **171**(6), 1607-1610. DOI: 10.1093/infdis/171.6.1607. ISSN 0022-1899. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/171.6.1607>
- ¹⁵⁴ WOODFIELD, D. G., M. HARNESS, K. RIX-TROTT, F. TSUDA, H. OKAMOTO and M. MAYUMI. Identification and genotyping of hepatitis C virus in injectable and oral drug users in New Zealand. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*. 1994, **24**(1), 47-50. DOI: 10.1111/j.1445-5994.1994.tb04425.x. ISSN 00048291. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1445-5994.1994.tb04425.x>
- ¹⁵⁵ NĚMEČEK, V., J. ČÁSTKOVÁ, P. FRITZ, A. LINHARTOVÁ, E. ŠVANDOVÁ, H. ŠRÁMOVÁ and B. KRÍŽ. The 2001 serological survey in the Czech Republic-viral hepatitis. *Cent Eur J Public Health*, 2003, **11**, suppl.: S54-61.
- ¹⁵⁶ HORÁK, J. a J. STRÍTEZKÝ. *Chronické hepatitidy*. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-716-9775-3.
- ¹⁵⁷ HUSA, P. *Léčba virových hepatitid*. Praha: Triton, 2000. Levou zadní. ISBN 80-725-4157-9.
- ¹⁵⁸ MRAVČÍK, V., P. CHOMYNOVÁ, K. GROHMANNOVÁ, et al. *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog pro Evropské monitorovací středisko pro drogy a drogové závislosti: Česká republika*. Praha: Úřad vlády ČR, 2017. ISBN 978-80-7440-219-7.
- ¹⁵⁹ ZABRANSKY, T., V. MRAVCIK, B. KORCIŠOVA and V. REHAK. Hepatitis C Virus Infection among Injecting Drug Users in the Czech Republic – Prevalence and Associated Factors. *European Addiction Research*. 2006, **12**(3), 151-160. DOI: 10.1159/000092117. ISSN 1022-6877. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/92117>
- ¹⁶⁰ KREKULOVÁ, L., V. ŘEHÁK, Z. OKTÁBEC and J. VACEK. HCV Genotype Shift Occurred Over the 15 years in PWIDs in the Czech Republic. *Epidemiologie Mikrobiologie Imunologie*. 2019, **68**(1), 3-8. Available from: <https://www.prolekare.cz/en/journals/epidemiology-microbiology-immunology/2019-1-20/hcv-genotype-shift-occurred-over-the-15-years-in-pwids-in-the-czech-republic-112615>
- ¹⁶¹ MRAVČÍK, V., P. CHOMYNOVÁ, K. GROHMANNOVÁ, et al. *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2018*. Praha: Úřad vlády ČR, 2019. ISBN 978-80-7440-237-1
- ¹⁶² MRAVČÍK, V. a ŠEBÁKOVÁ, H. Výskyt virových hepatitid typu B a C u injekčních uživatelů drog v okrese Karviná. *Adiktologie*, 2002, **2**(2), 19-27.
- ¹⁶³ MRAVČÍK, V., ed. *Výskyt VHC u injekčních uživatelů drog: Výsledky studie prováděné mezi klienty nízkoprahových zařízení v letech 2002–2005* [online]. Praha: Úřad vlády České republiky, 2009 [cit. 2020-01-27]. ISBN 9788074400032. Dostupné z: https://www.drogy-info.cz/data/download/91330/393423/file/5_Vyskyt_VHC_u_injekcnich_uzivatelu_drog_ePubl.pdf
- ¹⁶⁴ Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti. *Eliminace virové hepatitidy typu C mezi uživateli drog v České republice: východiska a akční plán na období 2019–2021*. Praha: Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti, 2019.
- ¹⁶⁵ Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost. *Evropská zpráva o drogách 2018: Trendy a vývoj*. Lucemburk: Úřad pro publikace Evropské unie, 2018. ISBN 978-92-9497-273-6. Dostupné z: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8585/20181816_TDAT18001CSN_PDF.pdf
- ¹⁶⁶ URBÁNEK, Petr. *Hepatitida C*. Praha: Mladá fronta, 2017. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-4410-3.

- ¹⁶⁷ GE, D., J. FELLAY, A. J. THOMPSON, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009, **461**(7262), 399-401. DOI: 10.1038/nature08309. ISSN 0028-0836. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature08309>
- ¹⁶⁸ THOMAS, D. L., C. L. THIO, M. P. MARTIN, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009, **461**(7265), 798-801. DOI: 10.1038/nature08463. ISSN 0028-0836. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature08463>
- ¹⁶⁹ TILLMANN, Hans L., Alex J. THOMPSON, Keyur PATEL, et al. A Polymorphism Near IL28B Is Associated With Spontaneous Clearance of Acute Hepatitis C Virus and Jaundice. *Gastroenterology*. 2010, **139**(5), 1586-1592.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.07.005. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508510010474>
- ¹⁷⁰ FARCI, Patrizia, Atsushi SHIMODA, Alessandra COIANA, et al. The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. *Science*. **288**(5464), 339-344. DOI: 10.1126/science.288.5464.339. ISSN 00368075. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.288.5464.339>
- ¹⁷¹ NOUREDDIN, M., E. C. WRIGHT, H. J. ALTER, et al. Association of IL28B genotype with fibrosis progression and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C: A longitudinal analysis. *Hepatology*. 2013, **58**(5), 1548-1557. DOI: 10.1002/hep.26506. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26506>
- ¹⁷² ZEIN, N. N., J. J. POTERUCHA, J. B. GROSS, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C genotype 1b. *The American Journal of Gastroenterology*. 1996, **91**(12), 2560-2562.
- ¹⁷³ DAVIS, G. L. and J. Y. LAU. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology*. 1997, **26**(S3), 122S-127S. DOI: 10.1002/hep.510260721. ISSN 0270-9139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.510260721>
- ¹⁷⁴ NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE PANEL. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement: Management of hepatitis C. *Hepatology*. 1997, **26**(S3), 2S-10S. DOI: 10.1002/hep.510260701. ISSN 0270-9139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.510260701>
- ¹⁷⁵ KANAI, K., M. KAKO, T. KUMADA, et al. High-dose (9 MU) long-term (60 weeks) alpha-interferon therapy for chronic hepatitis patients infected with HCV genotype 1b. *Archives of Virology*. 1998, **143**(8), 1545-1554. DOI: 10.1007/s007050050397. ISSN 0304-8608. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s007050050397>
- ¹⁷⁶ POZZATO, G., M. MORETTI, L. S. CROCÉ, et al. Interferon therapy in chronic hepatitis C virus: Evidence of different outcome with respect to different viral strains. *Journal of Medical Virology*. 1995, **45**(4), 445-450. DOI: 10.1002/jmv.1890450416. ISSN 01466615. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.1890450416>
- ¹⁷⁷ VEZZOLI, M., S. GIROLA, G. FOSSATI, I. MAZZUCHELLI, D. GRITTI and A. MAZZONE. Beta-interferon therapy of chronic hepatitis HCV+, 1b genotype. *Recenti progressi in medicina*. 1998, **89**(5), 235-240.
- ¹⁷⁸ ZEIN, N. N., J. RAKELA, E. L. KRAWITT, K. R. REDDY, T. TOMINAGA and D. H. PERSING. Hepatitis C Virus Genotypes in the United States: Epidemiology, Pathogenicity, and Response to Interferon Therapy. *Annals of Internal Medicine*. 1996, **125**(8). DOI: 10.7326/0003-4819-125-8-199610150-00002. ISSN 0003-4819. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-125-8-199610150-00002>
- ¹⁷⁹ MURASE, J., S. KUBO, S. NISHIGUCHI, K. HIROHASHI, T. SHUTO, T. IKEBE and H. KINOSHITA. Correlation of Clinicopathologic Features of Resected Hepatocellular Carcinoma with Hepatitis C Virus Genotype. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1999, **90**(12), 1293-1300. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1999.tb00711.x. ISSN 09105050. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00711.x>
- ¹⁸⁰ Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV). *Česká hepatologická společnost: České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně* [online]. 2019 [cit. 2020-01-13]. Dostupné z: <https://www.ces-hep.cz/file/596/2018-guidelines-hcv-chssil-1.pdf>
- ¹⁸¹ Management of Acute HCV Infection | HCV Guidance. *HCV Guidance: Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C* [online]. AASLD, 2019 [cit. 2020-01-12]. Available from: <https://www.hcvguidelines.org/unique-populations/acute-infection>
- ¹⁸² MARTINOT-PEIGNOUX, M., C. STERN, S. MAYLIN, et al. Twelve weeks posttreatment follow-up is as relevant as 24 weeks to determine the sustained virologic response in patients with hepatitis C virus receiving pegylated interferon and ribavirin. *Hepatology*. 2010, **51**(4), 1122-1126. DOI: 10.1002/hep.23444. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.23444>
- ¹⁸³ MAYLIN, S., M. MARTINOT-PEIGNOUX, R. MOUCARI, et al. Eradication of Hepatitis C Virus in Patients Successfully Treated for Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2008, **135**(3), 821-829. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.05.044. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508508008652>
- ¹⁸⁴ SIMMONS, B., J. SALEEM, A. HILL, R. D. RILEY and G. S. COOKE. Risk of Late Relapse or Reinfection With Hepatitis C Virus After Achieving a Sustained Virological Response: A Systematic Review and Meta-

- analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016, **62**(6), 683-694. DOI: 10.1093/cid/civ948. ISSN 1058-4838. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ948>
- ¹⁸⁵ AFDHAL, N., G. T. EVERSON, J. L. CALLEJA, et al. Effect of viral suppression on hepatic venous pressure gradient in hepatitis C with cirrhosis and portal hypertension. *Journal of Viral Hepatitis*. 2017, **24**(10), 823-831. DOI: 10.1111/jvh.12706. ISSN 13520504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12706>
- ¹⁸⁶ KIM, R. W., A. MANNALITHARA, H. LEE, A. OSINUSI, R. E. A. SCHALL and D. M. BRAINARD. Survival benefit of direct acting antiviral therapy in patients with decompensated cirrhosis. *Hepatology*. 2017, **66**, LB27.
- ¹⁸⁷ GREENBERG, H. B., R. B. POLLARD, L. I. LUTWICK, P. B. GREGORY, W. S. ROBINSON and T. C. MERIGAN. Effect of Human Leukocyte Interferon on Hepatitis B Virus Infection in Patients with Chronic Active Hepatitis. *New England Journal of Medicine*. 1976, **295**(10), 517-522. DOI: 10.1056/NEJM197609022951001. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197609022951001>
- ¹⁸⁸ HOOFNAGLE, J. H., K. D. MULLEN, D. B. JONES, et al. Treatment of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis with Recombinant Human Alpha Interferon: A preliminary report. *New England Journal of Medicine*. 1986, **315**(25), 1575-1578. DOI: 10.1056/NEJM198612183152503. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198612183152503>
- ¹⁸⁹ DORR, Robert T. Interferon-alpha in Malignant and Viral Diseases. *Drugs*. 1993, **45**(2), 177-211. DOI: 10.2165/00003495-199345020-00003. ISSN 0012-6667. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-199345020-00003>
- ¹⁹⁰ SOLINAS, A., P. COSSU, P. PODDIGHE, A. TOCCO, A. DEPLANO, G. GARRUCCIU a M. S. A. DIANA. Changes of serum 2',5'-oligoadenylate synthetase activity during interferon treatment of chronic hepatitis C. *Liver*. 1993, **13**(5), 253-258. DOI: 10.1111/j.1600-0676.1993.tb00640.x. ISSN 01069543. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0676.1993.tb00640.x>
- ¹⁹¹ POYNARD, T., P. MARCELLIN, S. S. LEE, et al. Randomised trial of interferon α 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *The Lancet*. 1998, **352**(9138), 1426-1432. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)07124-4. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673698071244>
- ¹⁹² HELCL, J. *Chronické hepatitidy v ordinaci praktického lékaře: [zásady diagnostiky a léčby chronických hepatitid]*. Praha: Maxdorf, 1997. ISBN 80-858-0064-0.
- ¹⁹³ TESTONI, B., M. LEVRERO and D. DURANTE. Mechanism of action of ribavirin in anti-HCV regimens: new insights for an age-old question? *Gut*. 2013, **63**(1), 3-4. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304528. ISSN 0017-5749. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2013-304528>
- ¹⁹⁴ MCHUTCHISON, J. G., S. C. GORDON, E. R. SCHIFF, et al. Interferon Alfa-2b Alone or in Combination with Ribavirin as Initial Treatment for Chronic Hepatitis C. *New England Journal of Medicine*. 1998, **339**(21), 1485-1492. DOI: 10.1056/NEJM199811193392101. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199811193392101>
- ¹⁹⁵ GLUE, P., J. W. FANG, R. ROUZIER-PANIS, C. RAFFANEL, R. SABO, S. K. GUPTA, M. SALFI and S. JACOBS. *Pegylated interferon- α 2b: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data*. **68**(5), 556-567. DOI: 10.1067/mcp.2000.110973. ISSN 00099236. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1067/mcp.2000.110973>
- ¹⁹⁶ HEATHCOTE, E. J., M. L. SHIFFMAN, W. G. E. COOKSLEY, et al. Peginterferon Alfa-2a in Patients with Chronic Hepatitis C and Cirrhosis. *New England Journal of Medicine*. 2000, **343**(23), 1673-1680. DOI: 10.1056/NEJM200012073432302. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200012073432302>
- ¹⁹⁷ REDDY, K., K. R. REDDY, T. L. WRIGHT, et al. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon α -2a compared with interferon α -2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2001, **33**(2), 433-438. DOI: 10.1053/jhep.2001.21747. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1053/jhep.2001.21747>
- ¹⁹⁸ TREPO, C., K. LINDSAY, C. NIEDERAU, et al. Pegylated interferon alfa-2B (PEG-intron) mono-therapy is superior to interferon alfa-2B (intron A) for the treatment of chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 2000, **32**. DOI: 10.1016/S0168-8278(00)80446-8. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827800804468>
- ¹⁹⁹ ZEUZEM, S., S. V. FEINMAN, J. RASENACK, et al. Peginterferon Alfa-2a in Patients with Chronic Hepatitis C. *New England Journal of Medicine*. 2000, **343**(23), 1666-1672. DOI: 10.1056/NEJM200012073432301. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200012073432301>
- ²⁰⁰ FRIED, Michael W., Mitchell L. SHIFFMAN, K. Rajender REDDY, et al. Peginterferon Alfa-2a plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. 2002, **347**(13), 975-982. DOI: 10.1056/NEJMoa020047. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa020047>

- ²⁰¹ HADZIYANNIS, Stephanos J., Mitchell L. SHIFFMAN, K. Rajender REDDY, et al. Peginterferon- α 2a and Ribavirin Combination Therapy in Chronic Hepatitis C. *Annals of Internal Medicine*. 2004, **140**(5), 975-982. DOI: 10.7326/0003-4819-140-5-200403020-00010. ISSN 0003-4819. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-140-5-200403020-00010>
- ²⁰² GAO, B., F. HONG and S. RADAIEVA. Host factors and failure of interferon- α treatment in hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004, **39**(4), 880-890. DOI: 10.1002/hep.20139. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20139>
- ²⁰³ ASSELAH, Tarik, Patrick MARCELLIN and Raymond F. SCHINAZI. Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure?. *Liver International*. 2018, **38**(2), 7-13. DOI: 10.1111/liv.13673. ISSN 14783223. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/liv.13673>
- ²⁰⁴ LAMARRE, D., P. C. ANDERSON, M. BAILEY, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*. 2003, **426**(6963), 186-189. DOI: 10.1038/nature02099. ISSN 0028-0836. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature02099>
- ²⁰⁵ LAM, A. M. I. a D. N. FRICK. Hepatitis C Virus Subgenomic Replicon Requires an Active NS3 RNA Helicase. *Journal of Virology*. 2005, **80**(1), 404-411. DOI: 10.1128/JVI.80.1.404-411.2006. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.80.1.404-411.2006>
- ²⁰⁶ BERAN, R. K. F., V. SEREBROV a A. M. PYLE. The Serine Protease Domain of Hepatitis C Viral NS3 Activates RNA Helicase Activity by Promoting the Binding of RNA Substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**(48), 34913-34920. DOI: 10.1074/jbc.M707165200. ISSN 0021-9258. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M707165200>
- ²⁰⁷ AYDIN, C., S. MUKHERJEE, A. M. HANSON, D. N. FRICK a C. A. SCHIFFER. The interdomain interface in bifunctional enzyme protein 3/4A (NS3/4A) regulates protease and helicase activities. *Protein Science*. 2013, **22**(12), 1786-1798. DOI: 10.1002/pro.2378. ISSN 09618368. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pro.2378>
- ²⁰⁸ FOSTER, G. R., C. HEZODE, J.-P. BRONOWICKI, et al. Activity of telaprevir alone or in combination with peginterferon alfa-2a and ribavirin in treatment-naïve genotype 2 and 3 hepatitis-C patients: interim results of study C209. *Journal of Hepatology*. 2009, **50**(Supplement 1), S22. DOI: 10.1016/S0168-8278(09)60052-0. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827809600520>
- ²⁰⁹ MCGIVERN, D. R., T. MASAKI, S. WILLIFORD, et al. Kinetic Analyses Reveal Potent and Early Blockade of Hepatitis C Virus Assembly by NS5A Inhibitors. *Gastroenterology*. 2014, **147**(2), 453-462.e7. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.04.021. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508514005472>
- ²¹⁰ MASAKI, T., R. SUZUKI, K. MURAKAMI, et al. Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles. *Journal of Virology*. 2008, **82**(16), 7964-7976. DOI: 10.1128/JVI.00826-08. ISSN 0022-538X. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00826-08>
- ²¹¹ PFLUGHEBER, J., B. FREDERICKSEN, R. SUMPTER, C. WANG, F. WARE, D. L. SODORA and M. GALE. Regulation of PKR and IRF-1 during hepatitis C virus RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, **99**(7), 4650-4655. DOI: 10.1073/pnas.062055699. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.062055699>
- ²¹² REISS, S., I. REBHAN, P. BACKES, et al. Recruitment and Activation of a Lipid Kinase by Hepatitis C Virus NS5A Is Essential for Integrity of the Membranous Replication Compartment. *Cell Host & Microbe*. 2011, **9**(1), 32-45. DOI: 10.1016/j.chom.2010.12.002. ISSN 19313128. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312810004129>
- ²¹³ REGHELLIN, V., L. DONNICI, S. FENU, et al. NS5A Inhibitors Impair NS5A-Phosphatidylinositol 4-Kinase III α Complex Formation and Cause a Decrease of Phosphatidylinositol 4-Phosphate and Cholesterol Levels in Hepatitis C Virus-Associated Membranes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014, **58**(12), 7128-7140. DOI: 10.1128/AAC.03293-14. ISSN 0066-4804. Available from: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.03293-14>
- ²¹⁴ CHUKKAPALLI, Vineela, Kristi L. BERGER, Sean M. KELLY, Meryl THOMAS, Alexander DEITERS a Glenn RANDALL. Daclatasvir inhibits hepatitis C virus NS5A motility and hyper-accumulation of phosphoinositides. *Virology*. 2015, **476**, 168-179. DOI: 10.1016/j.virol.2014.12.018. ISSN 00426822. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682214005558>
- ²¹⁵ BIANCO, A., V. REGHELLIN, L. DONNICI, et al. Metabolism of Phosphatidylinositol 4-Kinase III α -Dependent PI4P Is Subverted by HCV and Is Targeted by a 4-Anilino Quinazoline with Antiviral Activity. *PLoS Pathogens*. 2012, **8**(3). DOI: 10.1371/journal.ppat.1002576. ISSN 1553-7374. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002576>

- ²¹⁶ VOAKLANDER R. and I. M. JACOBSON. Sofosbuvir, velpatasvir and voxilaprevir combination for the treatment of hepatitis C. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2017, **11**(9), 789-795. DOI: 10.1080/17474124.2017.1351295. ISSN 1747-4124. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17474124.2017.1351295>
- ²¹⁷ LAMB, Y. N. Glecaprevir/Pibrentasvir: First Global Approval. *Drugs*. 2017, **77**(16), 1797-1804. DOI: 10.1007/s40265-017-0817-y. ISSN 0012-6667. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40265-017-0817-y>
- ²¹⁸ *Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C | HCV Guidance* [online]. American Association for the Study of Liver Diseases and the Infectious Diseases Society of America, ©2014-2019 [cit. 2019-09-05]. Available from: <https://www.hcvguidelines.org/>
- ²¹⁹ EASL. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *Journal of Hepatology*. 2017, **66**(1), 153-194. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.09.001. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827816304895>
- ²²⁰ FRIDELL, R. A., C. WANG, J.-H. SUN, et al. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in Humans: In Vitro and In Vivo Correlations. *Hepatology*. 2011, **54**(6), 1924-1935. DOI: 10.1002/hep.24594. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.24594>
- ²²¹ PAWLOTSKY, J.-M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology*. 2016, **151**(1), 70-86. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.04.003. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508516300555>
- ²²² ZOULIM, F., T. J. LIANG, A. L. GERBES, et al. Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. *Gut*. 2015, **64**(11), 1824-1833. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310421. ISSN 0017-5749. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2015-310421>
- ²²³ SARRAZIN, C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *Journal of Hepatology*. 2016, **64**(2), 486-504. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.09.011. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827815006297>
- ²²⁴ ABRAVANEL, F., S. MÉTIVIER, M. CHAUVEAU, J.-M. PÉRON and J. IZOPET. Transmission of HCV NS5A Inhibitor-Resistant Variants Among HIV-Infected Men Who Have Sex With Men. *Clinical Infectious Diseases*. DOI: 10.1093/cid/ciw554. ISSN 1058-4838. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciw554>
- ²²⁵ ZEUZEM, S., M. MIZOKAMI, S. PIANKO, et al. NS5A resistance-associated substitutions in patients with genotype 1 hepatitis C virus: Prevalence and effect on treatment outcome. *Journal of Hepatology*. 2017, **66**(5), 910-918. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.01.007. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827817300119>
- ²²⁶ GAO, M., R. E. NETTLES, M. BELEMA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature*. 2010, **465**(7294), 96-100. DOI: 10.1038/nature08960. ISSN 0028-0836. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature08960>
- ²²⁷ GUEDJ, J., H. DAHARI, L. RONG, et al. Modeling shows that the NS5A inhibitor daclatasvir has two modes of action and yields a shorter estimate of the hepatitis C virus half-life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, **110**(10), 3991-3996. DOI: 10.1073/pnas.1203110110. ISSN 0027-8424. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1203110110>
- ²²⁸ GOTTSWEIN, J. M., L. V. PHAM, L. S. MIKKELSEN, L. GHANEM, S. RAMIREZ, T. K.H. SCHEEL, T. H.R. CARLSEN and J. BUKH. Efficacy of NS5A Inhibitors Against Hepatitis C Virus Genotypes 1-7 and Escape Variants. *Gastroenterology*. 2018, **154**(5), 1435-1448. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.12.015. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508517367203>
- ²²⁹ MA, H., V. LEVEQUE, A. DE WITTE, W. LI, T. HENDRICKS, S. M. CLAUSEN, N. CAMMACK and K. KLUMPP. Inhibition of native hepatitis C virus replicase by nucleotide and non-nucleoside inhibitors. *Virology*. 2005, **332**(1), 8-15. DOI: 10.1016/j.virol.2004.11.024. ISSN 00426822. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682204007895>
- ²³⁰ GENTILE, Ivan, Alberto Enrico MARAOLLO, A. R. BUONOMO, E. ZAPPULO and G. BORGIA. The discovery of sofosbuvir: a revolution for therapy of chronic hepatitis C. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2015, **10**(12), 1363-1377. DOI: 10.1517/17460441.2015.1094051. ISSN 1746-0441. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17460441.2015.1094051>
- ²³¹ SARRAZIN, C. and S. ZEUZEM. Resistance to Direct Antiviral Agents in Patients With Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology*. 2010, **138**(2), 447-462. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.11.055. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508509021131>

- ²³² JACOBSON, I. M., G. J. DORE, G. R. FOSTER, et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2014, **384**(9941), 403-413. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60494-3. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614604943>
- ²³³ MANNS, M., P. MARCELLIN, F. POORDAD, et al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a or 2b plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2014, **384**(9941), 414-426. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60538-9. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614605389>
- ²³⁴ LAWITZ, E., A. MANGIA, D. WYLES, et al. Sofosbuvir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Infection. *New England Journal of Medicine*. 2013, **368**(20), 1878-1887. DOI: 10.1056/NEJMoa1214853. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1214853>
- ²³⁵ LAWITZ, E., F. POORDAD, D. M. BRAINARD, et al. Sofosbuvir with peginterferon-ribavirin for 12 weeks in previously treated patients with hepatitis C genotype 2 or 3 and cirrhosis. *Hepatology*. 2015, **61**(3), 769-775. DOI: 10.1002/hep.27567. ISSN 0270-9139. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.27567>
- ²³⁶ DORE, G. J., E. LAWITZ, C. HÉZODE, et al. Daclatasvir Plus Peginterferon and Ribavirin Is Noninferior to Peginterferon and Ribavirin Alone, and Reduces the Duration of Treatment for HCV Genotype 2 or 3 Infection. *Gastroenterology*. 2015, **148**(2), 355-366.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.10.007. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508514012062>
- ²³⁷ HÉZODE, C., G. M. HIRSCHFIELD, W. GHESQUIERE, et al. Daclatasvir plus peginterferon alfa and ribavirin for treatment-naive chronic hepatitis C genotype 1 or 4 infection: a randomised study. *Gut*. 2015, **64**(6), 948-956. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307498. ISSN 0017-5749. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2014-307498>
- ²³⁸ SULKOWSKI, M. S., D. F. GARDINER, M. RODRIGUEZ-TORRES, et al. Daclatasvir plus Sofosbuvir for Previously Treated or Untreated Chronic HCV Infection. *New England Journal of Medicine*. 2014, **370**(3), 211-221. DOI: 10.1056/NEJMoa1306218. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1306218>
- ²³⁹ NELSON, D. R., J. N. COOPER, J. P. LALEZARI, et al. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology*. 2015, **61**(4), 1127-1135. DOI: 10.1002/hep.27726. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.27726>
- ²⁴⁰ LOK, A. S., D. F. GARDINER, E. LAWITZ, et al. Preliminary Study of Two Antiviral Agents for Hepatitis C Genotype 1. *New England Journal of Medicine* [online]. 2012, **366**(3), 216-224. DOI: 10.1056/NEJMoa1104430. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1104430>
- ²⁴¹ ZEUZEM, S., G. M. DUSHEIKO, R. SALUPERE, et al. Sofosbuvir and Ribavirin in HCV Genotypes 2 and 3. *New England Journal of Medicine*. 2014, **370**(21), 1993-2001. DOI: 10.1056/NEJMoa1316145. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1316145>
- ²⁴² LAWITZ, E., G. MATUSOW, E. DEJESUS, et al. Simeprevir plus sofosbuvir in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection and cirrhosis: A phase 3 study (OPTIMIST-2). *Hepatology*. 2016, **64**(2), 360-369. DOI: 10.1002/hep.28422. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.28422>
- ²⁴³ LAWITZ, E., F. F. POORDAD, P. S. PANG, et al. Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naive and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet*. 2014, **383**(9916), 515-523. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62121-2. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613621212>
- ²⁴⁴ AFDHAL, N., S. ZEUZEM, P. KWO, et al. Ledipasvir and Sofosbuvir for Untreated HCV Genotype 1 Infection. *New England Journal of Medicine*. 2014, **370**(20), 1889-1898. DOI: 10.1056/NEJMoa1402454. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1402454>
- ²⁴⁵ AFDHAL, N., K. R. REDDY, D. R. NELSON, et al. Ledipasvir and Sofosbuvir for Previously Treated HCV Genotype 1 Infection. *New England Journal of Medicine*. 2014, **370**(16), 1483-1493. DOI: 10.1056/NEJMoa1316366. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1316366>
- ²⁴⁶ KOWDLEY, K. V., E. LAWITZ, F. POORDAD, et al. Phase 2b Trial of Interferon-free Therapy for Hepatitis C Virus Genotype 1. *New England Journal of Medicine*. 2014, **370**(3), 222-232. DOI: 10.1056/NEJMoa1306227. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1306227>
- ²⁴⁷ BOURLIÈRE, M., J.-P. BRONOWICKI, V. DE LEDINGHEN, et al. Ledipasvir-sofosbuvir with or without ribavirin to treat patients with HCV genotype 1 infection and cirrhosis non-responsive to previous protease-inhibitor

- therapy: a randomised, double-blind, phase 2 trial (SIRIUS). *The Lancet Infectious Diseases*. 2015, **15**(4), 397-404. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)70050-2. ISSN 14733099. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309915700502>
- ²⁴⁸ EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. *EASL | The Home of Hepatology* [online]. EASL, 2019 [cit. 2019-09-05]. Available from: <https://easl.eu/wp-content/uploads/2018/10/HCV-English-report.pdf>
- ²⁴⁹ CHARLTON, M., G. T. EVERSON, S. L. FLAMM, et al. Ledipasvir and Sofosbuvir Plus Ribavirin for Treatment of HCV Infection in Patients With Advanced Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015, **149**(3), 649-659. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.05.010. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508515006824>
- ²⁵⁰ . MANNS, M., D. SAMUEL, E. J. GANE, et al. Ledipasvir and sofosbuvir plus ribavirin in patients with genotype 1 or 4 hepatitis C virus infection and advanced liver disease: a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016, **16**(6), 685-697. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)00052-9. ISSN 14733099. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916000529>
- ²⁵¹ Harvoni, INN-ledipasvir, sofosbuvir. *European Medicines Agency* [online]. European Medicines Agency, 2019 [cit. 2019-09-30]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/harvoni-epar-product-information_en.pdf
- ²⁵² FELD, J. J., K. V. KOWDLEY, E. COAKLEY, et al. Treatment of HCV with ABT-450/r–Ombitasvir and Dasabuvir with Ribavirin. *New England Journal of Medicine*. 2014, **370**(17), 1594-1603. DOI: 10.1056/NEJMoa1315722. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1315722>
- ²⁵³ FERENCI, P., D. BERNSTEIN, J. LALEZARI, et al. ABT-450/r–Ombitasvir and Dasabuvir with or without Ribavirin for HCV. *New England Journal of Medicine*. 2014, **370**(21), 1983-1992. DOI: 10.1056/NEJMoa1402338. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1402338>
- ²⁵⁴ ANDREONE, P., M. G. COLOMBO, J. V. ENEJOSA, et al. ABT-450, Ritonavir, Ombitasvir, and Dasabuvir Achieves 97% and 100% Sustained Virologic Response With or Without Ribavirin in Treatment-Experienced Patients With HCV Genotype 1b Infection. *Gastroenterology*. 2014, **147**(2), 359-365.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.04.045. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508514006039>
- ²⁵⁵ POORDAD, F., C. HEZODE, R. TRINH, et al. ABT-450/r–Ombitasvir and Dasabuvir with Ribavirin for Hepatitis C with Cirrhosis. *New England Journal of Medicine*. 2014, **370**(21), 1973-1982. DOI: 10.1056/NEJMoa1402869. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1402869>
- ²⁵⁶ HÉZODE, C., T. ASSELAH, K. R. REDDY, et al. Ombitasvir plus paritaprevir plus ritonavir with or without ribavirin in treatment-naïve and treatment-experienced patients with genotype 4 chronic hepatitis C virus infection (PEARL-I): a randomised, open-label trial. *The Lancet*. 2015, **385**(9986), 2502-2509. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60159-3. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615601593>
- ²⁵⁷ FELD, J. J., I. M. JACOBSON, C. HÉZODE, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *New England Journal of Medicine*. 2015, **373**(27), 2599-2607. DOI: 10.1056/NEJMoa1512610. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1512610>
- ²⁵⁸ FOSTER, G. R., N. AFDHAL, S. K. ROBERTS, et al. Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 2 and 3 Infection. *New England Journal of Medicine*. 2015, **373**(27), 2608-2617. DOI: 10.1056/NEJMoa1512612. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1512612>
- ²⁵⁹ ZEUZEM, S., R. GHALIB, K. R. REDDY, et al. Grazoprevir–Elbasvir Combination Therapy for Treatment-Naïve Cirrhotic and Noncirrhotic Patients With Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1, 4, or 6 Infection. *Annals of Internal Medicine*. 2015, **163**(1). DOI: 10.7326/M15-0785. ISSN 0003-4819. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/M15-0785>
- ²⁶⁰ LAWITZ, E., E. GANE, B. PEARLMAN, et al. Efficacy and safety of 12 weeks versus 18 weeks of treatment with grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) with or without ribavirin for hepatitis C virus genotype 1 infection in previously untreated patients with cirrhosis and patients with previous null response with or without cirrhosis (C-WORTHY): a randomised, open-label phase 2 trial. *The Lancet*. 2015, **385**(9973), 1075-1086. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61795-5. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614617955>
- ²⁶¹ SULKOWSKI, M., C. HEZODE, J. GERSTOFT, et al. Efficacy and safety of 8 weeks versus 12 weeks of treatment with grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) with or without ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1 mono-infection and HIV/hepatitis C virus co-infection (C-WORTHY): a randomised, open-label phase 2 trial. *The Lancet*. 2015, **385**(9973), 1087-1097. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61793-1. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614617931>
- ²⁶² KWO, P., E. J. GANE, C.-Y. PENG, et al. Effectiveness of Elbasvir and Grazoprevir Combination, With or Without Ribavirin, for Treatment-Experienced Patients With Chronic Hepatitis C Infection. *Gastroenterology*.

- 2017, **152**(1), 164-175.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.045. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508516351708>
- ²⁶³ Zepatier, INN-grazoprevir/elbasvir. *European Medicines Agency* [online]. European Medicines Agency, 2019 [cit. 2019-09-30]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zepatier-epar-product-information_en.pdf
- ²⁶⁴ ROTH, David, D. R. NELSON, A. BRUCHFELD, et al. Grazoprevir plus elbasvir in treatment-naive and treatment-experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4–5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): a combination phase 3 study. *The Lancet*. 2015, **386**(10003), 1537-1545. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00349-9. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615003499>
- ²⁶⁵ Vosevi, INN-sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir. *European Medicines Agency* [online]. European Medicines Agency, 2019 [cit. 2019-09-30]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vosevi-epar-product-information_en.pdf
- ²⁶⁶ JACOBSON, I. M., E. LAWITZ, E. J. GANE, et al. Efficacy of 8 Weeks of Sofosbuvir, Velpatasvir, and Voxilaprevir in Patients With Chronic HCV Infection: 2 Phase 3 Randomized Trials. *Gastroenterology*. 2017, **153**(1), 113-122. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.03.047. ISSN 00165085. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508517353994>
- ²⁶⁷ BOURLIÈRE, M., S. C. GORDON, S. L. FLAMM, et al. Sofosbuvir, Velpatasvir, and Voxilaprevir for Previously Treated HCV Infection. *New England Journal of Medicine*. 2017, **376**(22), 2134-2146. DOI: 10.1056/NEJMoa1613512. ISSN 0028-4793. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1613512>
- ²⁶⁸ EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *EASL | The Home of Hepatology* [online]. EASL, 2019 [cit. 2019-09-05]. Available from: <https://easl.eu/wp-content/uploads/2018/10/HepC-English-report.pdf>
- ²⁶⁹ World Health Organisation (WHO). *Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016-2021: Towards Ending Viral Hepatitis*. Geneva: World Health Organization, 2016. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246177/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf?sequence=1>
- ²⁷⁰ SHARMA, S. A. and J. J. FELD. Acute Hepatitis C: Management in the Rapidly Evolving World of HCV. *Current Gastroenterology Reports*. 2014, **16**(2). DOI: 10.1007/s11894-014-0371-7. ISSN 1522-8037. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11894-014-0371-7>
- ²⁷¹ EDLIN, B. R., B. J. ECKHARDT, M. A. SHU, S. D. HOLMBERG and T. SWAN. Toward a more accurate estimate of the prevalence of hepatitis C in the United States. *Hepatology*. 2015, **62**(5), 1353-1363. DOI: 10.1002/hep.27978. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.27978>
- ²⁷² DENNISTON, M. M., R. M. KLEVEN, G.M. MCQUILLAN and R. B. JILES. Awareness of infection, knowledge of hepatitis C, and medical follow-up among individuals testing positive for hepatitis C: National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2008. *Hepatology*. 2012, **55**(6), 1652-1661. DOI: 10.1002/hep.25556. ISSN 02709139. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.25556>
- ²⁷³ MITCHELL, O. and A. GURAKAR. Management of Hepatitis C Post-liver Transplantation: a Comprehensive Review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2015, **3**(2). DOI: 10.14218/JCTH.2015.00005. ISSN 22250719. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4548349/pdf/JCTH-3-140.pdf>
- ²⁷⁴ LIMKETKAI, B. N., S. H. MEHTA, C. G. SUTCLIFFE, et al. Relationship of Liver Disease Stage and Antiviral Therapy With Liver-Related Events and Death in Adults Coinfected With HIV/HCV. *JAMA*. 2012, **308**(4). DOI: 10.1001/jama.2012.7844. ISSN 0098-7484. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2012.7844>
- ²⁷⁵ HICKMAN, M., D. DE ANGELIS, P. VICKERMAN, S. HUTCHINSON and N. K. MARTIN. Hepatitis C virus treatment as prevention in people who inject drugs. *Current Opinion in Infectious Diseases* [online]. 2015, **28**(6), 576-582 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000216. ISSN 0951-7375. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00001432-201512000-00012>
- ²⁷⁶ HEFFERNAN, A., G. S. COOKE, S. NAYAGAM, M. THURSZ and T. B. HALLETT. Scaling up prevention and treatment towards the elimination of hepatitis C: a global mathematical model. *The Lancet*. 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32277-3. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618322773>
- ²⁷⁷ DILLON, J. F., J. V. LAZARUS and H. A. RAZAVI. Urgent action to fight hepatitis C in people who inject drugs in Europe. *Hepatology, Medicine and Policy*. 2016, **1**(1). DOI: 10.1186/s41124-016-0011-y. ISSN 2059-5166. Available from: <http://hmap.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41124-016-0011-y>
- ²⁷⁸ MARTIN, N. K., P. VICKERMAN and M. HICKMAN. Mathematical modelling of hepatitis C treatment for injecting drug users. *Journal of Theoretical Biology*. 2011, **274**(1), 58-66. DOI: 10.1016/j.jtbi.2010.12.041. ISSN 00225193. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519311000038>

- ²⁷⁹ TUCKER, J. D., K. MEYERS, J. BEST, et al. The HepTestContest: a global innovation contest to identify approaches to hepatitis B and C testing. *BMC Infectious Diseases*. 2017, **17**(S1). DOI: 10.1186/s12879-017-2771-4. ISSN 1471-2334. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2771-4>
- ²⁸⁰ EDLAND-GRYT, M. and A. H. SKATVEDT. Thresholds in a low-threshold setting: An empirical study of barriers in a centre for people with drug problems and mental health disorders. *International Journal of Drug Policy*. 2013, **24**(3), 257-264. DOI: 10.1016/j.drugpo.2012.08.002. ISSN 09553959. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955395912001193>
- ²⁸¹ HAJARIZADEH, B., E. B. CUNNINGHAM, H. REID, M. LAW, G. J. DORE and J. GREBELY. *Direct-acting antiviral treatment for hepatitis C among people who use or inject drugs: a systematic review and meta-analysis*. 2018, **3**(11), 754-767. DOI: 10.1016/S2468-1253(18)30304-2. ISSN 24681253. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468125318303042>
- ²⁸² GREBELY, J., S. LARNEY, A. PEACOCK, et al. Global, regional, and country-level estimates of hepatitis C infection among people who have recently injected drugs. *Addiction*. 2019, **114**(1), 150-166. DOI: 10.1111/add.14393. ISSN 09652140. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/add.14393>
- ²⁸³ HAGAN, H., E. R. POUGET, D. C. DES JARLAIS and C. LELUTIU-WEINBERGER. Meta-Regression of Hepatitis C Virus Infection in Relation to Time Since Onset of Illicit Drug Injection: The Influence of Time and Place. *American Journal of Epidemiology*. 2008, **168**(10), 1099-1109. DOI: 10.1093/aje/kwn237. ISSN 0002-9262. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwn237>
- ²⁸⁴ WIESSING, Lucas, Marica FERRI, Bart GRADY, et al. Hepatitis C Virus Infection Epidemiology among People Who Inject Drugs in Europe: A Systematic Review of Data for Scaling Up Treatment and Prevention. *PLoS ONE*. 2014, **9**(7), 1099-1109. DOI: 10.1371/journal.pone.0103345. ISSN 1932-6203. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103345>
- ²⁸⁵ DEGENHARDT, L., F. CHARLSON, J. STANAWAY, et al. Estimating the burden of disease attributable to injecting drug use as a risk factor for HIV, hepatitis C, and hepatitis B: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016, **16**(12), 1385-1398. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30325-5. ISSN 14733099. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309916303255>
- ²⁸⁶ DEGENHARDT, L., A. PEACOCK, S. COLLEDGE, et al. Global prevalence of injecting drug use and sociodemographic characteristics and prevalence of HIV, HBV, and HCV in people who inject drugs: a multistage systematic review. *The Lancet Global Health*. 2017, **5**(12), e1192-e1207. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30375-3. ISSN 2214109X. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X17303753>
- ²⁸⁷ LARNEY, Sarah, Amy PEACOCK, Janni LEUNG, et al. Global, regional, and country-level coverage of interventions to prevent and manage HIV and hepatitis C among people who inject drugs: a systematic review. *The Lancet Global Health*. 2017, **5**(12), e1208-e1220. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30373-X. ISSN 2214109X. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X1730373X>
- ²⁸⁸ PLATT, L., S. MINOZZI, J. REED, et al. Needle and syringe programmes and opioid substitution therapy for preventing HCV transmission among people who inject drugs: findings from a Cochrane Review and meta-analysis. *Addiction*. 2018, **113**(3), 545-563. DOI: 10.1111/add.14012. ISSN 09652140. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/add.14012>
- ²⁸⁹ HAGAN, H., E. R. POUGET a D. C. DES JARLAIS. A Systematic Review and Meta-Analysis of Interventions to Prevent Hepatitis C Virus Infection in People Who Inject Drugs. *Journal of Infectious Diseases*. 2011, **204**(1), 74-83. DOI: 10.1093/infdis/jir196. ISSN 0022-1899. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jir196>
- ²⁹⁰ LARNEY, S., A. PEACOCK, J. LEUNG, et al. Global, regional, and country-level coverage of interventions to prevent and manage HIV and hepatitis C among people who inject drugs: a systematic review. *The Lancet Global Health*. 2017, **5**(12), e1208-e1220. DOI: 10.1016/S2214-109X(17)30373-X. ISSN 2214109X. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X1730373X>
- ²⁹¹ RAZAVI, H., I. WAKED, C. SARRAZIN, et al. The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *Journal of Viral Hepatitis*. 2014, **21**, Suppl 1: 34-59. DOI: 10.1111/jvh.12248. ISSN 13520504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12248>
- ²⁹² MARTIN, N. K., P. VICKERMAN, G. J. DORE a M. HICKMAN. The hepatitis C virus epidemics in key populations (including people who inject drugs, prisoners and MSM). *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2015, **10**(5), 374-380. DOI: 10.1097/COH.000000000000179. ISSN 1746-630X.
- ²⁹³ HARRIS, M., E. ALBERS a T. SWAN. The promise of treatment as prevention for hepatitis C: Meeting the needs of people who inject drugs?. *International Journal of Drug Policy*. 2015, **26**(10), 963-969. DOI:

- 10.1016/j.drugpo.2015.05.005. ISSN 09553959. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955395915001383>
- ²⁹⁴ ALAVI, M., J. D. RAFFA, G. D. DEANS, C. LAI, M. KRAJDEN, G. J. DORE, M. W. TYNDALL and J. GREBELY. Continued low uptake of treatment for hepatitis C virus infection in a large community-based cohort of inner city residents. *Liver International*. 2014, **34**(8), 1198-1206. DOI: 10.1111/liv.12370. ISSN 14783223. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/liv.12370>
- ²⁹⁵ MIDGARD, H., J. G. BRAMNESS, S. SKURTVEIT, J. W. HAUKELAND, O. DALGARD and Y. E. KHUDYAKOV. Hepatitis C Treatment Uptake among Patients Who Have Received Opioid Substitution Treatment: A Population-Based Study. *PLOS ONE*. 2016, **11**(11), e0166451. DOI: 10.1371/journal.pone.0166451. ISSN 1932-6203. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0166451>
- ²⁹⁶ STRATHDEE, Steffanie A, Timothy B HALLETT, Natalia BOBROVA, Tim RHODES, Robert BOOTH a ABDOOL. HIV and risk environment for injecting drug users: the past, present, and future. *The Lancet*. 2010, **376**(9737). DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60743-X. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361060743X>
- ²⁹⁷ WOLFE, Daniel, M Patrizia CARRIERI a Donald SHEPARD. Treatment and care for injecting drug users with HIV infection: a review of barriers and ways forward. *The Lancet*. 2010, **376**(9738), 355-366. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60832-X. ISSN 01406736. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067361060832X>
- ²⁹⁸ DORE, G. J., F. ALTICE, A. H. LITWIN, et al. Elbasvir–Grazoprevir to Treat Hepatitis C Virus Infection in Persons Receiving Opioid Agonist Therapy. *Annals of Internal Medicine*. 2016, **165**(9). DOI: 10.7326/M16-0816. ISSN 0003-4819. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/M16-0816>
- ²⁹⁹ CHRISTENSEN, S., P. BUGGISCH, S. MAUSS, et al. Direct-acting antiviral treatment of chronic HCV-infected patients on opioid substitution therapy: Still a concern in clinical practice?. *Addiction*. 2018, **113**(5), 868-882. DOI: 10.1111/add.14128. ISSN 09652140. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/add.14128>
- ³⁰⁰ PALMATEER, N. E., A. TAYLOR, D. J. GOLDBERG, et al. Rapid Decline in HCV Incidence among People Who Inject Drugs Associated with National Scale-Up in Coverage of a Combination of Harm Reduction Interventions. *PLoS ONE*. 2014, **9**(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0104515. ISSN 1932-6203. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104515>
- ³⁰¹ COOK, C. and C. DAVIES. *The lost decade: Neglect for harm reduction funding and the health crisis among people who use drug*. London, United Kingdom: Harm Reduction International, 2018. ISBN 978-0-9935434-6-3. Available from: <https://www.hri.global/files/2018/09/25/lost-decade-harm-reduction-funding-2018.PDF>
- ³⁰² MIDGARD, H., B. BJØRO, A. MÆLAND, et al. Hepatitis C reinfection after sustained virological response. *Journal of Hepatology*. 2016, **64**(5), 1020-1026. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.01.001. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827816000039>
- ³⁰³ MIDGARD, H., A. WEIR, N. PALMATEER, V. LO RE, J. A. PINEDA, J. MACÍAS and O. DALGARD. HCV epidemiology in high-risk groups and the risk of reinfection. *Journal of Hepatology*. 2016, **65**(1), S33-S45. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.07.012. ISSN 01688278. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827816303361>
- ³⁰⁴ SIMMONS, B., J. SALEEM, A. HILL, R. D. RILEY and G. S. COOKE. Risk of Late Relapse or Reinfection With Hepatitis C Virus After Achieving a Sustained Virological Response: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016, **62**(6), 683-694. DOI: 10.1093/cid/civ948. ISSN 1058-4838. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ948>
- ³⁰⁵ DORE, G. J., J. GREBERLY, F. ALTICE, et al. Hepatitis C Virus (HCV) Reinfection and Injecting Risk Behavior Following Elbasvir (EBR)/Grazoprevir (GZR) Treatment in Participants on Opiate Agonist Therapy (OAT): Co-STAR Part B [ABSTRACT 195]. *Hepatology*. 2017, **66**(S1), 112A. DOI: 10.1002/hep.29500. ISSN 02709139. Available from: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/hep.29500>
- ³⁰⁶ PAGE, K., M. D. MORRIS, J. A. HAHN, L. MAHER and M. PRINS. Injection Drug Use and Hepatitis C Virus Infection in Young Adult Injectors: Using Evidence to Inform Comprehensive Prevention. *Clinical Infectious Diseases*. 2013, **57**(suppl_2), S32-S38. DOI: 10.1093/cid/cit300. ISSN 1537-6591. Available from: http://academic.oup.com/cid/article/57/suppl_2/S32/397297/Injection-Drug-Use-and-Hepatitis-C-Virus-Infection
- ³⁰⁷ HAGAN, H., E. R. POUGET, D. C. DES JARLAIS and C. LELUTIU-WEINBERGER. Meta-Regression of Hepatitis C Virus Infection in Relation to Time Since Onset of Illicit Drug Injection: The Influence of Time and Place. *American Journal of Epidemiology*. 2008, **168**(10), 1099-1109. DOI: 10.1093/aje/kwn237. ISSN 0002-9262. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwn237>
- ³⁰⁸ FREEMAN, A. J., HARVEY, C. E., MARINOS, G., et al. Hepatitis C prevalence among Australian injecting drug users in the 1970s and profiles of virus genotypes in the 1970s and 1990s. *The Medical Journal of Australia*, 2000,

- 172(12), 588-591. DOI: 10.5694/j.1326-5377.2000.tb124124.x. ISSN 1326-5377 Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/j.1326-5377.2000.tb124124.x>
- ³⁰⁹ VINCE, A., D. PALMOVIĆ, N. KUTELA, Z. SONICKY, T. JEREN and M. RADOVANI. HCV genotypes in patients with chronic hepatitis C in Croatia. *Infection*. 1998, **26**(3), 173-177. DOI: 10.1007/BF02771846. ISSN 0300-8126. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02771846>
- ³¹⁰ MIAGOSTOVICH, M. P., F. B. DOS SANTOS, C. M. GUTIÉRREZ, L. W. RILEY a E. HARRIS. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, **38**(3), 1286-1289.
- ³¹¹ DAVIDSON, F., P. SIMMONDS, J. C. FERGUSON, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *Journal of General Virology*. 1995, **76**(5), 1197-1204. DOI: 10.1099/0022-1317-76-5-1197. ISSN 0022-1317. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-76-5-1197>
- ³¹² Boom R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen and J. van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990, **28**(3), 495-503. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269651/>
- ³¹³ LAU, J. Y.N., G. L. DAVIS, L. E. PRESCOTT, G. MAERTENS, K. L. LINDSAY, K. QIAN, M. MIZOKAMI a P. SIMMONDS. Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes Determined by Line Probe Assay in Patients with Chronic Hepatitis C Seen at Tertiary Referral Centers in the United States. *Annals of Internal Medicine*. 1996, **124**(10). DOI: 10.7326/0003-4819-124-10-199605150-00002. ISSN 0003-4819. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-124-10-199605150-00002>
- ³¹⁴ LI, J. S., S. P. TONG, L. VITVITSKI and C. TRÉPO. Single-step nested polymerase chain reaction for detection of different genotypes of hepatitis C virus. *Journal of Medical Virology*. 1995, **45**(2), 151-155.
- ³¹⁵ STUYVER, L., R. ROSSAU, A. WYSEUR, M. DUHAMEL, B. VANDERBORGHT, H. VAN HEUVERSWYN a G. MAERTENS. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *Journal of General Virology*. 1993, **74**(6), 1093-1102. DOI: 10.1099/0022-1317-74-6-1093. ISSN 0022-1317. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-74-6-1093>
- ³¹⁶ VĚCHETOVÁ, S., L. KREKULOVÁ, Z. OKTÁBEC a V. ŘEHÁK. Vysoká prevalence virové hepatitidy C ve vyloučené komunitě brněnských Romů. *Epidemiologie Mikrobiologie Imunologie*. 2019, **68**(3), 115-121. Dostupné také z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/epidemiologie/2019-3-23/vysoka-prevalence-virove-hepatitidy-c-ve-vyloucene-komunitě-brněnských-romu-119848>
- ³¹⁷ KOUYOUMJIAN, S. P., H. CHEMAITELLY and L. J. ABU-RADDAD. Characterizing hepatitis C virus epidemiology in Egypt: systematic reviews, meta-analyses, and meta-regressions. *Scientific Reports*. 2018, **8**(1). DOI: 10.1038/s41598-017-17936-4. ISSN 2045-2322. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-17936-4>
- ³¹⁸ ACKELSBERG, J. and J. K. VARMA (coordinators). *Hepatitis C in New York City: State of the Epidemic and Action Plan*. NYC Health, 2013.
- ³¹⁹ MEHTA, S. H., B. L. GENBERG, J. ASTEMBORSKI, R. KAVASERY, G. D. KIRK, D. VLAHOV, S. A. STRATHDEE and D. L. THOMAS. Limited Uptake of Hepatitis C Treatment Among Injection Drug Users. *Journal of Community Health*. 2008, **33**(3), 126-133. DOI: 10.1007/s10900-007-9083-3. ISSN 0094-5145. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10900-007-9083-3>
- ³²⁰ GREBELY, J., J. D. RAFFA, C. LAI, M. KRAJDEN, T. KERR, B. FISCHER and M. W. TYNDALL. Low uptake of treatment for hepatitis C virus infection in a large community-based study of inner city residents. *Journal of Viral Hepatitis*. 2009, **16**(5), 352-358. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2009.01080.x. ISSN 13520504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2893.2009.01080.x>