

Janusz Ślusarczyk<sup>1</sup>, Jolanta Białkowska<sup>2</sup>, Bożena Bucholc<sup>1</sup>, Aldona Wiatrzyk<sup>1</sup>,  
Paulina Górską<sup>1</sup>, Maciej Jabłkowski<sup>2</sup>

## GENOTYPY HBV U PACJENTÓW Z PRZEWLEKŁYM ZAPALENIEM WĄTROBY TYPU B Z TERENU CENTRALNEJ POLSKI\*

<sup>1</sup> Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa  
Kierownik: Janusz Ślusarczyk

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Kierownik: Daniela Dworniak

*W pracy przedstawiono wyniki oznaczeń genotypów HBV w grupie 65 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B pochodzących z terenu centralnej Polski. Surowice krwi, stanowiące materiał do badań, otrzymano od osób nieleczonych lekami przeciwwirusowymi ani immunomodulacyjnymi. Stwierdzono, że najczęściej występuje genotyp A (86,1% badanych), a rzadziej genotyp D (9,2%) i genotyp mieszany A+D (4,6%).*

*Słowa kluczowe: genotypy HBV w Polsce, przewlekłe zapalenie wątroby typu B*  
*Key words: HBV genotypes in Poland, chronic hepatitis B*

### WSTĘP

Zmiany w genomie HBV pojawiające się na przestrzeni czasu spowodowały zróżnicowanie genetyczne wirusa, związane z różnicami w sekwencji nukleotydów wirusowego DNA (1,2). Obecnie znanych jest osiem genotypów HBV oznaczonych literami od A do H, a różnice w sekwencji nukleotydów pomiędzy nimi wynoszą w całym genomie co najmniej 8% (3,4). Zainteresowanie budzi szereg zagadnień związanych z samym wirusem i znaczeniem zmienności genetycznej, rozmieszczenie geograficzne poszczególnych genotypów HBV na świecie, jak i znaczenie genotypów dla skuteczności leczenia pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B (pzw B) (5,6).

Dotychczas zidentyfikowane różnice pomiędzy izolatami HBV wpływające na długość nici DNA zawierają się w przedziale 3182-3248 nukleotydów (2,6). Mutacje w sekwencjach nukleotydów danego genotypu wirusa mogą ewentualnie wyjaśniać występowanie takich odmienności przebiegu choroby, jak częste pojawianie się przypadków

---

\* Źródło finansowania: praca własna nr 502-15-346 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i dotacja dla Zakładu Badania Surowic i Szczepionek z funduszy na działalność statutową PZH.

pzw B HBeAg - ujemnego w krajach basenu Morza Śródziemnego, w których dominuje genotyp D (7). Jednakże rozmieszczenie geograficzne genotypów HBV nie jest statyczne i może ulegać zmianom, na które mogą mieć wpływ takie czynniki, jak migracje ludności lub mutacje wywołane presją leków przeciwwirusowych (8).

Opublikowane z terenu Polski północnej badania *Bielawskiego* i wsp. (9) wskazują na znaczną przewagę zakażeń wywołanych HBV o genotypie A, co potwierdzają wyniki badań *Zalewskiej* i wsp. (10). Celem obecnych badań była analiza występowania genotypów HBV wśród pacjentów z pzw B z terenu centralnej Polski: mieszkańców województwa łódzkiego i mazowieckiego. Pacjenci byli badani przed rozpoczęciem terapii przeciwwirusowej, do której zostali zakwalifikowani po wykonaniu badań wirusologicznych, biochemicznych i ocenie morfologii tkanki wątroby.

#### MATERIAŁ I METODY

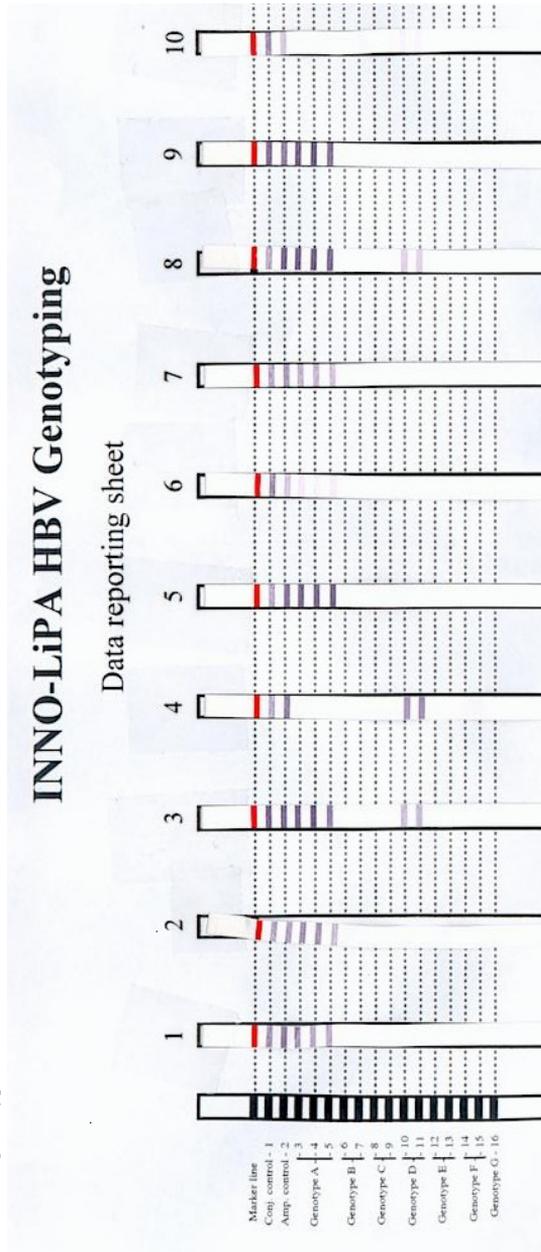
Materiał do badań stanowiły surowice krwi od grupy 65 pacjentów (18 kobiet i 47 mężczyzn) z pzw typu B w wieku od 18 do 80 lat (średnio: 42,3). Pacjenci byli hospitalizowani w latach 2004-2006 w Klinice Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do badań genotypu HBV mieli udowodnioną obecność HBsAg w surowicy krwi co najmniej od 6 miesięcy i nikt z tej grupy nie posiadał przeciwciał anty-HDV ani anty-HCV. Pod względem markerów układu HBeAg/anty-HBe stwierdzono 54 (83%) pacjentów HBeAg-dodatnich, 6 (9,2%) anty-HBe-dodatnich, natomiast u 5 osób z tej grupy (7,6%) nie wykrywano ani HBeAg, ani anty-HBe. Żaden z pacjentów do momentu badania genotypu HBV nie był leczony lekami przeciwwirusowymi ani immunomodulacyjnymi. Markery serologiczne zakażenia HBV, HCV i HDV oznaczano w surowicy krwi pacjentów odpowiednimi komercyjnymi testami immunoenzymatycznymi przy użyciu aparatu Cobas Core II (Roche Diagnostics).

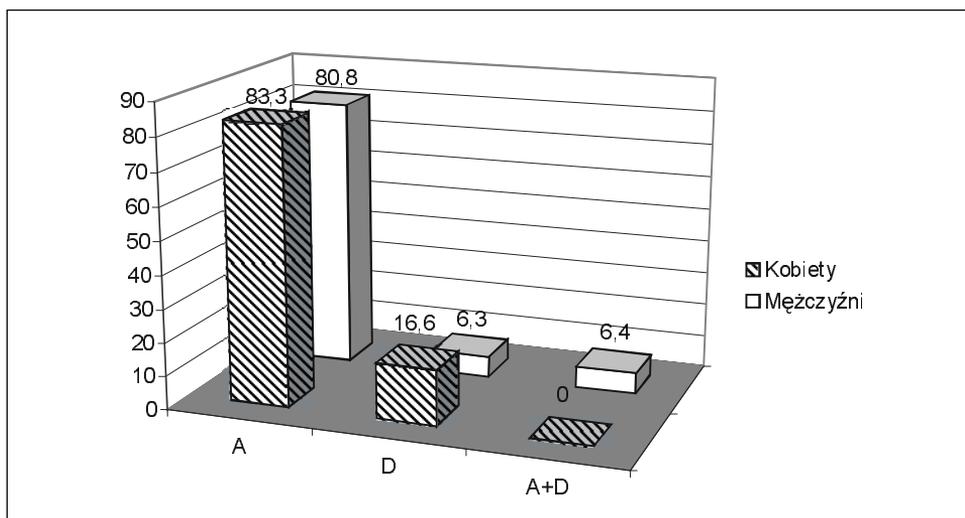
Oznaczanie genotypu HBV przeprowadzono przy użyciu komercyjnego testu „Inno-LiPA HBV Genotyping” produkcji „Innogenetics” (Belgia). Test pozwala na oznaczenie genotypu HBV na podstawie wykrywania w genie *pol* sekwencji charakterystycznych dla genotypów od A do G. Metoda oznaczania polega na izolacji HBV DNA z surowicy krwi i amplifikacji fragmentu genu *pol* techniką polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). Znakowane biotyną primery oligonukleotydów stosowane są w pierwszej reakcji amplifikacji w celu uzyskania produktu o długości 409 par zasad (bp). Podczas drugiej fazy amplifikacji techniką wewnętrznego polimerazowej reakcji łańcuchowej amplifikowana jest sekwencja 342 bp. Znakowane produkty reakcji PCR są następnie hybrydyzowane z sondami genetycznymi swoistymi dla poszczególnych genotypów, oplaszczonymi na fazie stałej. Genotyp HBV jest następnie określany na podstawie porównania z referencyjnymi standardami.

#### WYNIKI

Genotyp A stwierdzono u 56 z 65 (86,1%) badanych osób, genotyp D u 6 z 65 (9,2%) osób i genotyp mieszany A+D u 3 z 65 (4,6%) osób (ryc. 1). Genotyp mieszany A+D stwierdzono wyłącznie w grupie mężczyzn. U kobiet genotyp A stwierdzono u 15 z 18 (83,3%) badanych, natomiast genotyp D u 3 z 18 (16,6%) badanych pacjentek. W grupie

Ryc. 1. Identyfikacja genotypów HBV testem „INNO LiPA Genotyping”. Próbkę surowicę krwi w pozycjach 1, 2, 5, 6, 7 i 9 zawierającą HBV DNA o genotypie A, w pozycji 4 i 10 genotyp D, (w pozycji 10 słabo widoczne prążki nr 10 i 11) a w pozycjach 3 i 8 genotyp mieszany A+D  
 Fig. 1. Identification of the HBV genotype by means of „INNO LiPA Genotyping” assay. Serum samples in the positions 1, 2, 5, 6, 7 and 9 contain HBV DNA with genotype A, in the positions 4 and 10 (in the position 10 poorly visible strips no 10 end 11) and in the positions 4 and 8 mixed genotype A+D





Ryc. 2. Rozkład (%) genotypów HBV w grupie kobiet (n=18) i mężczyzn (n=47) z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B z terenu centralnej Polski

Fig. 2. The distribution (%) of HBV genotypes in the groups of women (n=18) and men (n=47) with chronic hepatitis B living in the area of central Poland

Tabela I. Występowanie genotypów HBV i markerów układu HBeAg / anti-HBeAg wśród pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby (n = 65)

Table I. The prevalence of HBV genotypes and HBeAg / anti-HBeAg markers among patients with chronic hepatitis B (n = 65)

Genotyp	Pzw B* HBeAg (+)	Pzw B Anti- HBeAg (+)	Pzw B HBeAg (-) Anti- HBeAg (-)
A (n = 56)	49	6	1
D (n = 6)	4	0	2
A+D (n = 3)	1	0	2

\* Przewlekłe zapalenie wątroby typu B

mężczyzn genotyp A stwierdzono u 38 z 47 (80,8%) osób, natomiast genotyp D u 3 z 47 (6,3%) badanych pacjentów (ryc. 2).

HBeAg wykryto u 49 z 56 (87,5%) osób z genotypem A, u 4 z 6 osób z genotypem D i u jednej osoby z genotypem mieszanym A+D. Anti-HBe wykryto wyłącznie u 6 spośród 56 (10,7%) osób z genotypem A. HBeAg ani anti-HBe były niewykrywalne u 1 osoby z genotypem A, u 2 osób z genotypem D i u 2 osób z genotypem mieszanym A+D (tab. 1).

## DYSKUSJA

Opublikowane dotychczas wyniki genotypowania HBV od pacjentów z terenu Polski wskazują na znaczną przewagę występowania genotypu A u pacjentów z pzw typu B. W obecnych badaniach genotyp A stwierdzono u 56 z 65 (86,1%) badanych osób, natomiast genotyp D u 6 z 65 (9,2%) pacjentów. Wśród 58 próbek badanych przez *Bielawskiego* i wsp. (9) genotyp A występował u 74,1% badanych, a genotyp D u 20,7%. W badaniach *Zalewskiej* i wsp. wykonanych u 66 pacjentów stwierdzono występowanie genotypu A u 78,8%, natomiast genotypu D u 13,6% (10). W grupie pacjentów badanych przez *Bielawskiego* i wsp. (9) stwierdzono również występowanie genotypu F u 5,2% osób. Genotyp F stwierdzono dotychczas głównie w populacjach Alaski, Dalekiego Wschodu i Ameryki Południowej (5). U 3 z 65 (4,6%) pacjentów w obecnych badaniach stwierdzono występowanie mieszanego genotypu A+D. W grupie badanej przez *Zalewską* i wsp. mieszany genotyp A+D stwierdzono u 1 z 66 (1,5%) badanych pacjentów (10). Wyniki dotychczasowych badań genotypów HBV na terenie kraju wskazują, że podobnie jak i w innych krajach europejskich, w Polsce dominują zakażenia genotypem A i D (5). Można przypuszczać, że zastosowanie tej samej metody do badań genotypu HBV przez *Zalewską* i wsp. (10) i przez nas umożliwiło identyfikację genotypów mieszanych w badanych próbkach. Spośród dotychczas głównie stosowanych metod genotypowania HBV: sekwencjonowania genomu wirusa, RFLP i LiPA, ta ostatnia metoda jest szczególnie przydatna zarówno do oznaczania mieszanych genotypów HBV, jak i do badań klinicznych i epidemiologicznych dużej liczby próbek. Inne metody genotypowania są bardziej przydatne do badań drobnoustrojów wykazujących duży polimorfizm DNA (11).

Znaczenie genotypu HBV w odniesieniu do przebiegu klinicznego pzw B jest obecnie przedmiotem dalszych badań. Opublikowane dotychczas wyniki wskazują, że pacjenci zakażeni HBV o genotypie A wykazują częściej remisję przewlekłego zakażenia (normalizacja aktywności aminotransferaz, eliminacja HBV DNA z krążenia) w porównaniu do pacjentów zakażonych HBV o genotypie D (12). Zakażenie HBV o genotypie D jest również związane z częstszym występowaniem ostrej niewydolności wątroby (13,14).

Związek genotypu HBV z odpowiedzią na leczenie przeciwwirusowe także wymaga dalszych badań. Wykonana retrospektywnie analiza wyników leczenia adefowirem pacjentów HBeAg–dodatnich i HBeAg–ujemnych w odniesieniu do genotypu HBV nie wykazała żadnego związku pomiędzy odpowiedzią na leczenie i genotypem (15). Z kolei wyniki badań *Zollnera* i wsp. (16) w grupie niemieckich pacjentów z pzw B leczonych lamiwudyną wskazują na szybsze pojawianie się oporności u pacjentów z genotypem A w porównaniu do pacjentów z genotypem D.

Można przypuszczać, że badania przedstawianej grupy pacjentów w przyszłości, po okresie leczenia przeciwwirusowego przyniosą nowe wyniki odnoszące się do znaczenia klinicznego genotypu HBV. Natomiast dalsze badania materiału z różnych regionów kraju pozwolą na zebranie danych dotyczących molekularnej epidemiologii zakażeń HBV w Polsce.

## WNIOSKI

1. Podobnie jak i w innych krajach europejskich, najczęściej występujące na terenie Polski zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B wywołane są genotypami A i D.

2. Zastosowanie testu „INNO LiPA Genotyping” jest szczególnie przydatne do oznaczania zakażeń HBV wywołanych mieszanymi genotypami wirusa.

*J Ślusarczyk, J Białkowska, B Bucholc, A Wiatrzyk, P Górski, M Jabłkowski*

HBV GENOTYPES AMONG PATIENTS WITH CHRONIC  
HEPATITIS B IN THE AREA OF CENTRAL POLAND

## SUMMARY

At present, eight (8) HBV genotypes have been identified, marked by letters from A to H. The distribution of particular genotypes, both in the world and in Poland, is the focus of particular epidemiological interest as well as its possible association with therapeutic efficacy of patients with chronic hepatitis B (CHB) undergoing antiviral therapy. The goal of the study was HBV genotype determination among patients with CHB living in the area of central Poland. There were 65 patients (18 females and 47 males) aged 18-80 years (mean: 42.3). All of the patients had HBsAg detectable for at least 6 months and previously they did not receive any antiviral or immunomodulating therapy. HBV genotyping was performed by means of commercial method “INNO LiPA Genotyping”. Genotype A was found in 56 out of 65 (86.6%) patients, genotype D in 6 out of 65 (9.2%), and mixed genotype A+D was found in 3 out of 65 (4.6%) patients. HBeAg was detected in 49 out of 56 (87.5%) persons with genotype A, in 4 out of 6 persons with genotype D and in one person with mixed genotype A+D. Mixed genotype A+D was found only among males. Anti-HBe was found exclusively among 6 out of 56 (10.7%) persons with genotype A. Both HBeAg and anti-HBe were undetectable in one person with genotype A, in 2 persons with genotype D and in 2 persons with mixed genotype A+D. The method applied for this study is particularly suitable for the determination of mixed HBV genotypes, as well as for clinical or epidemiological studies of a large numbers of samples. Future studies to be performed after an antiviral or other form of therapy in patients with CHB may bring some evidence on the influence of treatment in relation to HBV genotype. Further studies on HBV genotypes distribution in different regions of the country may allow to gather data on molecular epidemiology of HBV infection in Poland.

## PIŚMIENNICTWO

1. Norder H, Courouce A M, Magnius L O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-503.
2. Bartolomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004;14:3-16.
3. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, i in. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;83:2059-2073.
4. Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 2005;12:111-124.
5. Fung S K, Lok A S F. Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology* 2004;40:790-792.

6. Wai C T, Fontana F J. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants, and mutants. *Clin Liver Dis* 2004;8:321-352.
7. Funk M L, Rosenberg D M, Lok A S. World-wide epidemiology of HBeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat* 2002;9:52-61.
8. Chu C J, Keefe E B, Han S H, i in. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003;125:444-451.
9. Bielawski K P, Dybikowska A, Lisowska – Charmuszko U, i in. Distribution of HBV genotypes and mutants among hepatitis B infected patients from northern Poland. *Int J Molec Med* 2004;14:301-304.
10. Zalewska Małgorzata, Domagała Małgorzata, Simon Krzysztof i in. Występowanie genotypów wirusa zapalenia wątroby typu B oraz ich wpływ na skuteczność leczenia lamiwudyną. *Pol Arch Med Wewn* 2005;114:1190-1199.
11. Augustynowicz E, Gzyl A, Szenborn L, i in. Comparison of usefulness of randomly amplified polymorphic DNA and amplified-fragment length polymorphism techniques in epidemiological studies on nasopharyngeal carriage of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol* 2003;52:1005-1014.
12. Sanchez-Tapias E T, Costa J, Mas A, i in. Influence of hepatitis B virus genotype in long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-1856.
13. Wai C T, Fontana R J, Polson J, i in. Clinical outcome and virological characteristics of hepatitis B-related acute liver failure In the United States. *J Viral Hepat* 2005;75:513-521.
14. Garfein R S, Bower WA, Loney C M, i in. Factors associated with fulminant liver failure during an outbreak among injection drug users with acute hepatitis B. *Hepatology* 2004;40:865-873.
15. Chien R N, Eh C T, Tai S L, i in. Determinant for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003;38:1267-1273.
16. Zollner B, Petersen J, Puchhammer-Stockl E, i in. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004;39:42-50.

Otrzymano: 24. 07. 2006.

**Adres autorów:**

Prof. dr hab. med. Janusz Ślusarczyk  
Zakład Badania Surowic i Szczepionek Państwowy Zakład Higieny  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa  
tel.: 022-5421 212, fax: 022-5421 311  
jslusarczyk@pzh.gov.pl

**PODZIĘKOWANIA**

Autorzy dziękują dr Januszowi Andziakowi i mgr Agnieszce Krzeszowiak z firmy „Innogenetics” w Polsce za konsultacje dotyczące testu „INNO LiPA Genotyping”.