

*Ewa Brojer, Piotr Grabarczyk, Aneta Kopacz, Anna Potępa, Joanna Medyńska,
Justyna Smolarczyk-Wodzyńska, Magdalena Łętowska*

GENOTYPY HCV U POLSKICH DAWCÓW KRWI W OKRESIE 1995-2007¹

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej,
Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa
Kierownik Zakładu: Ewa Brojer

W pracy przeprowadzono analizę danych dotyczących polimorfizmu wirusa HCV wykrywanego u dawców krwi w Polsce w latach 1995-2007.

Słowa kluczowe: dawcy krwi, HCV RNA, genotypy
Key words: blood donors, HCV RNA, genotypes

WSTĘP PRZYCZYNY ZAINTERESOWANIA TRANSFUZJOLOGÓW BADANIAMI GENOTYPÓW HCV

Badania przeglądowe dawców w kierunku zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) rozpoczęto w Polsce, podobnie jak w innych krajach rozwiniętych w 1991 r. wkrótce po wykryciu wirusa i wprowadzeniu na rynek odpowiednich testów diagnostycznych (1). Badania wykonywano testami tzw. II generacji, w których stosowano białka rekombinowane produkowane na podstawie sekwencji genomu wirusa wyizolowanego od szympansa zakażonego materiałem zakaźnym od chorego z tzw. zapaleniem wątroby nie-A nie B. Konstrukcja testów kolejnych generacji (III i IV) dążyła do zwiększenia czułości i swoistości metod, między innymi poprzez stosowanie do ich produkcji peptydów syntetycznych stanowiących swoiste epitopy najbardziej immunogennych białek wirusa. Równoległe z badaniami nad białkami HCV prowadzono prace nad analizą sekwencji genomu różnych jego izolatów i wyodrębniono szereg genotypów wirusa. Okazało się wtedy, że pierwsze generacje testów diagnostycznych wyprodukowane zostały na podstawie jednego z wielu genotypów – genotypu 1a, który jest najczęstszym genotypem w Ameryce Północnej. Stwierdzono, że wykrywają one równie skutecznie zakażenie genotypem 1b, dominującym w krajach Europy. Wykazano natomiast różnice w czułości testów w stosunku do innych genotypów np. 3a i 4. (2). Wprowadzenie powszechnych badań przeglądowych anty-HCV, a następnie

¹ Praca częściowo finansowana z grantu MNiSW nr N404 116 32/3601

od roku 2000 RNA HCV spowodowało, że ryzyko szerzenia się zakażenia tym wirusem spadło praktycznie do zera – określa się je obecnie na około 1: 2 miliony przetoczeń (3).

Możemy wyróżnić trzy najważniejsze powody zainteresowania transfuzjologów badaniem genotypów i analizą sekwencji wirusa HCV: 1/ dbałość, by do badań dawców stosować czule i swoiste testy diagnostyczne wykrywające wszystkie występujące w danym kraju formy polimorficzne wirusa; 2/ możliwość analizy dróg przenoszenia wirusa w przypadkach podejrzenia zakażenia przez przetoczenie, 3/ związek genotypów i dróg szerzenia się wirusa - istotny w aspekcie wywiadów epidemiologicznych przy kwalifikacji dawcy do oddania krwi.

Ad 1. Celem badań przeglądowych w krwiodawstwie jest wykrycie zakażenia u wszystkich nosicieli wirusa. Wkrótce po odkryciu HCV wykazano, że cechuje się on wysokim stopniem polimorfizmu i że mogą istnieć nieznaczne różnice w reaktywności przeciwciał w zależności od genotypu. Z tego względu badania genotypów HCV u osób zakażonych w danym kraju stały się istotne dla transfuzjologów. Ważne było sprawdzenie, czy rozkład genotypów w Polsce nie odbiega od tego, który występuje w krajach rozwiniętych. Ponadto badania sekwencji i genotypów HCV były istotne dla potwierdzenia swoistości testów molekularnych, które były używane do potwierdzania zakażenia u dawców z przeciwciałami.

Takie badania są prowadzone w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie (IHiT) już od roku 1992 (4). Analiza sekwencji nukleotydowej regionu 5'UTR i E2/NS1 izolatów HCV od polskich dawców potwierdziła swoistość stosowanego w tym czasie testu „*home made*”. Stopień homologii z prototypem HCV-1 (genotyp amerykański- później 1a) i HCV-J (genotyp europejski- później 1b) wynosił odpowiednio dla regionu 5'UTR – 100% i 98,4%, a dla regionu E2/NS1 – 80,2% i 79,5%. Do chwili obecnej w procesach standaryzacji i oceny testów diagnostycznych dokonujemy analiz z użyciem próbek zawierających różne genotypy wirusa występujące u polskich krwiodawców. Przykład wyników badań jednego z rutynowo stosowanych testów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela I. Standaryzacja badań testem - CHIRON TMA HIV-1/HCV Assay. Wykrywanie różnych genotypów HCV u dawców bez przeciwciał anti-HCV

Table I. Standardization of CHIRON TMA HIV-1/HCV Assay. Detection of HCV genotypes in blood donors without anti-HCV

Genotyp	wyjściowa koncentracja HCV w próbce	Badane rozcieńczenia	Liczba powtórzeń	% wyników dodatnich
4c/4d	5,88 x 10 ⁴ IU/ml	x 10; 100; 500	8	100%
4c/4d	1,80 x 10 ⁴ IU/ml	x 10 ; 100; 500	8	100%
4c/4d	6,73 x 10 ⁴ IU/ml	x 10; 100; 500	8	100%
3a	4,16 x 10 ⁵ IU/ml	x 10; 100; 500	8	100%
3a	3,93 x 10 ⁵ IU/ml	x 10; 100; 500	8	100%
3a	6,46 x 10 ⁴ IU/ml	x 10; 100; 500	8	100%

Ad 2. Badania genotypów i sekwencjonowanie genomu są w transfuzjologii stosowane jako metoda dla potwierdzania/wykluczania zakażenia przez krew w indywidualnych, bardzo obecnie rzadkich przypadkach, gdy takie podejrzenie zachodzi. Dokonuje się wtedy badań sekwencji izolatu RNA HCV od dawcy i biorcy i analizuje stopień homologii fragmentów genomu wirusa. Taki sposób analizy zastosowano ostatnio w przypadku podejrzenia zaka-

żenia przez krew chorej z ostrym zapaleniem wątroby typu C (5). Wykazano, że stopień homologii regionów kodujących białka rdzenia C i regionu nadzmiennego 1 RNA HCV od chorej i dawcy, który w momencie oddania krwi znajdował się w bardzo wczesnym okresie „okienka serologicznego” wynosił 100%, podczas gdy izolat od innego dawcy zakażonego tym samym genotypem wykazywał niższy stopień homologii (96,8-98,2%).

Ad 3. W ostatnich latach podnoszony jest w literaturze związek genotypów HCV z drogami przenoszenia zakażenia np. związek genotypu 3a z przyjmowaniem dożylnych środków odurzających. Jest to ważny aspekt badań z punktu widzenia transfuzjologii. Dawcy krwi w procesie kwalifikacji do oddania krwi zaprzeczają co prawda, że należą do jakiegokolwiek z grup o podwyższonym ryzyku zakażenia. Niemniej jednak w niektórych przypadkach, już po wykryciu u nich zakażenia przypominają sobie o ryzykownych zachowaniach. Obserwacje dotyczące analizy genotypów mogą przyczynić się więc do zauważenia niepokojących tendencji i prowadzić do poprawy procesu kwalifikacji dawców do oddania krwi w danym regionie.

BADANIA GENOTYPÓW U POLSKICH KRWIODAWCÓW.

Badania genotypów u polskich krwiodawców przeprowadzano od roku 1993 (4,6-13). Nigdy nie były one badaniami masowymi. Wykonywane są metodą hybrydyzacji produktu PCR ze swoistymi sondami (InnoLipa HCV, Innogenetics). Grupy badane w początkowych latach były bardzo niewielkie (10 i 25 dawców), a od roku 1997 liczyły około 70 osób. Badano przypadkowo dobranych dawców z przeciwciałami anti-HCV, od których próbki otrzymywano z różnych regionów Polski. Ze względu na małą liczebność grup nie jest jednak możliwa analiza genotypów w różnych regionach kraju. Częstość genotypów w kolejnych latach przedstawiono w tabeli II. W ciągu całego okresu obserwacji najczęściej wykrywany był genotyp 1b; drugim co do częstości był genotyp 3a. Pozostałe genotypy wykrywane były w pojedynczych przypadkach. Częstość wykrywania genotypów u polskich krwiodawców nie różniła się od obserwowanej u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (pzw C) (7,8,9,12,13).

Tabela II. Genotypy HCV u dawców z przeciwciałami anti-HCV, w latach 1995-2007

Table II. HCV genotypes in blood donors with anti-HCV, in period 1995-2007

Lata	Liczba badanych	Genotypy (%)					
		1a	1b	2	3a	4c/d	Mieszane***
1995	44*	0	88,6	2,2	9,1	0	0
1996	25	0	92,0	0	8,0	0	0
1997-99	78	2,8	78,6	1,4	10	1,4	5,7
2000-03	70	4,3	75,7	0	14,3	4,3	0
2007	74	2,7	70,0**	0	20,2	5,4	2,7

*10 dawców i 34 chorych z pzw C

** w tym 8% genotyp 1

*** mieszane 1b/3a; 1b/4

Od 2000 r. wprowadzono w Polsce wirusologiczne badania przeglądowe technikami biologii molekularnej. Badana jest obecność RNA HCV u dawców bez przeciwciał, co

ma na celu wczesne wykrycie zakażenia u dawcy, zanim pojawią się u niego przeciwciała anti-HCV. Dawca, u którego wykrywa się HCV RNA, a nie wykrywa przeciwciał, uległ zakażeniu prawdopodobnie nie wcześniej niż 6 miesięcy przed przyjściem do Centrum Krwiodawstwa. Można więc przyjąć, że dawcy objęci przedstawioną niżej analizą ulegli zakażeniu około 2000 r. lub później. Od 2000 r. corocznie w Polsce wykrywa się od kilku do kilkunastu dawców w tak wczesnej fazie zakażenia (14). U wszystkich dawców HCV RNA(+)/anti-HCV(-) udokumentowano serokonwersję – pojawienie się przeciwciał anti-HCV w następnej lub w kolejnych próbkach.

Już w 2003 r., gdy analizowano częstość występowania genotypów u 50 dawców „w okienku serologicznym” zauważono, że dystrybucja genotypów w tej grupie różni się istotnie od obserwowanej u badanych w tym samym czasie dawców z przeciwciałami oraz chorych z pzw typu C (13). Stwierdzono statystycznie istotnie wyższą częstość występowania genotypu 3a (40%), a niższą genotypu 1b (36%) wśród dawców „z okienka” w porównaniu z dawcami anti-HCV(+) (3a-14%; 1b-75,7%) i chorymi z pzw C (3a-10,6; 1b-85,3%). U dawców z „okienka” częściej wykrywano też genotyp 4 (14%) w porównaniu z dawcami z przeciwciałami (4,3%) i chorymi z pzw C (1,2%). W dyskusji zamieszczonej we wspomnianej pracy (13) wśród przyczyn obserwowanych zjawisk rozważano: 1/ różnice w długości trwania zakażenia (dawcy z przeciwciałami i chorzy są prawdopodobnie zakażeni od dawna; dawcy w „okienku” zakazili się „ostatnio”, 2/ różnice w drogach zakażenia, 3/ zależność częstości samoograniczenia zakażenia od genotypu, 4/ dystrybucję geograficzną.

Dawcy RNA HCV dodatni bez przeciwciał prawdopodobnie ulegli zakażeniu nie wcześniej niż 6 miesięcy przed wykryciem RNA. Moment zakażenia dawców z przeciwciałami i chorych jest nieznan, lecz prawdopodobnie wcześniejszy niż u dawców z „okienka”. Rozważaliśmy więc, że obserwowane przez nas różnice mogą świadczyć o „inwazji genotypu 3a” i przewidywać pojawienie się w następnych latach większego odsetka chorych zakażonych genotypem 3a. Co do dróg zakażenia - przeprowadzone analizy nie wykazały, aby dawcy zakażeni genotypem 4 odwiedzali kraje, w których ten genotyp występuje często (np. Egipt). Nasze obserwacje nie wskazywały też, aby dawcy zakażeni genotypem 3a używali w przeszłości dożylnych narkotyków. Prawdopodobne drogi zakażenia ustaliliśmy retrospektywnie dla 10 z grupy 50 osób badanych. Jedynie u dwóch było to przyjmowanie dożylnie środków odurzających - jeden był zakażony genotypem 1b, a drugi 4c/4d. Uznaliśmy, że analiza dróg zakażenia u dawców zakażonych różnymi genotypami wymaga kontynuacji, podobnie jak analiza pozostałych czynników (dystrybucja geograficzna w różnych regionach Polski i samowyleczenie). Nie była ona możliwa ze względu na zbyt małą liczebność grupy i brak długo trwających obserwacji dawców.

Badania genotypów u dawców w IHiT były więc kontynuowane. W kolejnym analizowanym okresie lat od 2004 do 2007 badaniami objęto 42 dawców we wczesnym okresie zakażenia HCV. Tendencja wysokiej częstości genotypu 3a utrzymywała się – zidentyfikowano go u 54,8% (23/42) zakażonych dawców. W tabeli III przedstawiono skumulowane dane o częstości występowania genotypów w latach od 2000 do 2007, podsumowane w kwietniu 2007 roku. Ogółem badania wykonano u 92 osób, u których wykryto zakażenie w „okienku” lub/i u których stwierdzono pojawienie się przeciwciał przy kolejnym badaniu wykonanym w Centrum Krwiodawstwa oraz u 144 dawców, u których wykryto RNA HCV i przeciwciała anti-HCV, gdy po raz pierwszy przyszli do Centrum Krwiodawstwa z zamiarem oddania krwi. Podobnie jak podczas wykonanej w 2003 r. analizy wyników badania

dawców z markerami niedawnego zakażenia HCV w porównaniu z wynikami dawców z przeciwciałami anti-HCV wykazano statystycznie istotnie większą częstość genotypu 3a, a niższą genotypu 1b.

Tabela III. Porównanie częstości genotypów wśród dawców, u których wykryto markery świadczące o niedawnym zakażeniu wirusem i u dawców z przeciwciałami anti-HCV*

Table III. Comparison of genotype frequency in blood donors with anti-HCV and infected in window period

Dawcy	N	Genotyp (%)				
		1a	1b	3a	4c/d	Mieszany
Grupa A „okienko serologiczne” i serokonwersja anti-HCV	92	1,0	38,0	46,7	9,8	4,3
Grupa B Anti-HCV dodatni	144	3,5	72,9	17,4	4,9	0,7

*dane skumulowane z lat 2000-2007

W wywiadzie epidemiologicznym przeprowadzonym po wykryciu RNA HCV ustalono, że 10 spośród 92 dawców przyjmowało narkotyki dożylnie. U 6 z nich wykryto genotyp 3a, u 3 1b, a u 1 4c/d. Wpływ drogi zakażenia przez dożylnie przyjmowanie narkotyków jest więc obecnie widoczny, choć wyniki nie mogą być poddane analizie statystycznej ze względu na małą liczebność grup.

Analiza pozostałych czynników, które mogły wpłynąć na różnice w częstości występowania genotypów jest w dalszym ciągu możliwa tylko w ograniczonym zakresie. Wiadomo, że spośród dawców z „okienka” samoistnie wyeliminowało wirusa czterech (17%) – trzej byli zakażeni 1b, a jeden 3a. Te obserwacje nie potwierdzają hipotezy, że osoby zakażone genotypem 3a szybciej/łatwiej/skuteczniej eliminują zakażenie, co prowadzić mogłoby do tego, że wśród osób z przewlekłym zakażeniem jest większa częstość genotypu 1b.

Ważne informacje, choć wymagające jeszcze uzupełnienia badań w grupie kontrolnej (dawców z przeciwciałami anti-HCV), daje analiza dystrybucji geograficznej genotypów u dawców „niedawno zakażonych”. Tendencja do większej częstości występowania genotypu 3a, a mniejszej genotypu 1b w porównaniu z dystrybucją u osób z przeciwciałami jest wyraźniej zaznaczona na północnym wschodzie Polski (1b - 22%; 3a - 78%; n=18). Wśród 8 dawców z RCKiK w Białymstoku sześciu zostało zakażonych genotypem 3a, a dwóch genotypem 1b. Przewagę częstości występowania genotypu 3a nad genotypem 1b widać też w rejonach centralnej Polski (1b - 33%; 3a - 67%; n=9). Na północnym zachodzie (1b 62%; 3a 38%; n= 13) i na południowym zachodzie (1b 67%; 3a 33%; n=12) proporcje są odwrotne, a w rejonach południowo wschodnich częstość obu genotypów jest zbliżona (1b 55%; 3a 45%; n=22). W dwóch regionach, w których wśród dawców we wczesnym okresie zakażenia występowała przewaga genotypu 3a nad genotypem 1b wykonano badania u dawców pierwszorazowych z przeciwciałami anti-HCV. Wśród dawców z województwa podlaskiego i warmińsko-mazurskiego genotyp 1b wykryto u 62%, a genotyp 3a u 38% spośród 13 dawców. Wśród 48 dawców pierwszorazowych w centralnej Polsce genotyp 1b wykryto u 79%, a 3a u 21% osób. Przedstawione wyżej badania będą kontynuowane w miarę identyfikacji kolejnych dawców we wczesnym okresie zakażenia dzięki stosowanym

przeładowym badaniom molekularnym. Obejmiemy tymi badaniami również wszystkich krwiodawców wielokrotnych, u których wykryje się przeciwciała anti-HCV i RNA wirusa. Ważne będzie też skonfrontowanie uzyskanych wyników z wynikami u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C.

*E Brojer, P Grabarczyk, A Kopacz, A Potępa, J Medyńska, J Smolarczyk-Wodzyńska,
M Łętowska*

HCV GENOTYPES IN POLISH BLOOD DONORS IN PERIOD 1995-2007

SUMMARY

The results of HCV genotype distribution between 1995 and 2007 in Polish blood donors were analyzed. Special attention was drawn into the analysis of HCV polymorphism isolated from blood donors in the early phase of infection (RNA HCV positive/anti-HCV negative). Such donors identified in Poland since 2000 when the NAT for HCV was introduced are very important for molecular epidemiology analysis. The increasing frequency of 3a and 4 genotypes is observed in comparison to blood donors and patients with anti-HCV antibodies.

PIŚMIENNICTWO

1. Głowska-Moraczewska Z, Kacperska E, Seyfried H. Ocena testów przeglądowych i uzupełniających, służących do wykrywania przeciwciał anti-HCV. *Acta Haematologica Polonica* 1993, 44, 3: 273-280.
2. Alfonso C., Qu D, Lamerin JP. I In. Serological responses to different genotype of hepatitis C virus in France. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 211-212.
3. Stramer S.L. US NAT yield: where are we after 2 years ? *Transfusion Clinique et Biol* 2003; 10: 10-18.
4. Stańczak JJ, Brojer E, Radlińska M, Medyńska J, Seyfried H. Partial nucleotide sequences and genotypes of hepatitis C virus (HCV) isolated in Polish blood donors and patients with hepatitis. *Hepatol Pol* 1995; 2: 87-92.
5. Grabarczyk P, Gronowska A, Brojer E, Łętowska M, Radziwon P. Sequence analysis of HCV RNA confirmed post-transfusion hepatitis caused by a low viremic donation negative in mini-pool NAT. *Transfusion* 2007; 47(6): 1102-4.
6. Brojer E. HCV RNA detection and genotyping in candidates for blood donors and patients with hepatitis. *Hepatology Polska*, 1998, 5, 75-81
7. Brojer E, Głowska-Moraczewska Z, Kacperska E i in. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in blood donors and patients with chronic hepatitis C. *Vox Sang* 1996; 71: 51-4.
8. Brojer E, Medyńska J, Grabarczyk P, Kryczka W i in. HCV genotype analysis in Polish blood donors and patients with hepatitis. *Centr-Europ J Immunol* 1997; 22(3): 164.
9. Brojer E. HCV RNA detection and genotyping in candidates for blood donors and patients with hepatitis. *Hepatol Pol* 1998; 5: 75-81.
10. Adamowicz-Salach A, Pawelec K, Łoch T i in. Incidence and treatment of hepatitis C virus infection in children with haemophilia in Poland. *Haemophilia* 1999; 5: 436-444.
11. Brojer E, Kryczka W, Medyńska J i in. Anti-HCV RIBA/LiaTek reactivity and HCV genotype in EIA-negative patients with viremia. *J Med Virol* 1999; 59: 451-5.

12. Brojer E, Grabarczyk P, Medyńska J, i in. Analiza częstości występowania genotypów wirusa HCV u chorych na zapalenie wątroby oraz u bezobjawowych nosicieli wirusa w różnych regionach kraju – badania wielośrodkowe. *Hepatoł Pol* 2000; 7(1): 53-5.
13. Brojer E, Gronowska A, Medyńska J, i in. The HCV genotype frequency in HCV RNA positive/anti-HCV negative blood donors identified in NAT screening program in Poland. *Transfusion* 2004; 44(12): 1706-10.
14. Brojer E, Łętowska M, Gronowska A, i in. Rozpoznanie wczesnego etapu zakażenia HCV u dawców krwi poprzez badanie RNA HCV- nowe wyzwanie dla transfuzjologii i hepatologii. *Pol Merk Lek* 2004; 17 (1000): 321-325.

PODZIĘKOWANIA

Badania przeglądowe HCV RNA u dawców krwi wykonane były w Pracowniach Biologii Molekularnej Regionalnych Centrów Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku, Bydgoszczy, Gdańsku, Kaliszu, Kielcach, Krakowie, Łodzi, Poznaniu, Raciborzcu, Rzeszowie, Szczecinie i Warszawie. Wszystkie te Centra, a także Centra w Słupsku, Olsztynie, Zielonej Górze, Katowicach, i Radomiu prowadziły badania serologiczne oraz dostarczały do IHiT próbki osocza dawców. Dziękujemy wszystkim Pracownikom RCKiK za ich wysiłek.

Otrzymano 24.10.2007 r.

Adres autora:

Prof. dr hab. Ewa Brojer
Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Ul. Chocimska 5, Warszawa 00-957
Tel. 0 22 849 36 51 wew. 204
e-mail: ebrojer@ihit.waw.pl