

Badanie polimorfizmu wirusów przenoszonych drogą krwi w Polsce — wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) oraz parwowirusa B19 (B19V)

Study on polymorphism of the transfusion transmitted viruses in Poland — hepatitis B virus (HBV) and parvovirus B19 (B19V)

Piotr Grabarczyk

Pracownia Biologii Molekularnej Wirusów, Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Spis treści:

Streszczenie	46
Summary	48
1. Wstęp	49
1.1. Badania wirusologiczne u polskich dawców krwi	49
1.2. Znaczenie badania polimorfizmu wirusów przenoszonych przez krew	50
1.3. Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV)	50
1.3.1. Biologia molekularna HBV	50
1.3.1.1. Genotypy, podtypy, warianty oraz typy serologiczne	51
1.3.2. Przebieg zakażenia HBV	52
1.3.3. Epidemiologia HBV	53
1.4. Parwowirus B19 (B19V)	54
1.4.1. Biologia molekularna i polimorfizm B19V	54
1.4.2. Przebieg zakażenia B19V	55
1.4.3. Epidemiologia B19V	55
2. Cele	55
3. Materiał i metody	56
3.1. Materiał	56
3.1.1. Dawcy zakażeni HBV	56
3.1.2. Pacjenci zakażeni B19V	56
3.2. Metody	56
3.2.1. Charakterystyka molekularna HBV	56
3.2.2. Charakterystyka molekularna B19V	57
3.2.3. Badanie markerów serologicznych zakażenia HBV oraz B19V	57
4. Wyniki	57
4.1. HBV	57
4.1.1. Wirusologiczna i molekularna charakterystyka dawców zakażonych HBV na wczesnym etapie zakażenia	57
4.1.2. Ogólna charakterystyka wirusologiczna dawców z antygenem HBs	58
4.1.3. Szczegółowa charakterystyka genomu HBV od dawców z antygenem HBs	61
4.1.3.1. Region Pre-S/S	61
4.1.3.2. BCP/PC	63

Adres do korespondencji: dr n. biol. Piotr Grabarczyk, Pracownia Biologii Molekularnej Wirusów, Zakład Wirusologii IHIT, ul. Chocimska 5, 00–957 Warszawa, tel.: (22) 349 66 00 wewn. 144, e-mail: pgrabarczyk@ihit.waw.pl

4.1.3.3. Polimeraza i gen X	64
4.1.4. Wirusologiczna i molekularna charakterystyka dawców z ukrytym zakażeniem HBV	65
4.1.5. Dystrybucja geograficzna genotypów HBV	66
4.2. Parwovirus B19 (B19V)	66
4.2.1. Ogólna charakterystyka kliniczna i wirusologiczna chorych zakażonych B19V	66
4.2.2. Analiza sekwencji B19V	66
4.2.3. Przebieg zakażenia genotypem 2 B19V	69
5. Dyskusja	69
5.1. HBV	71
5.2. B19V	73
6. Podsumowanie i wnioski	76
7. Podziękowania	76

Streszczenie

Wstęp: *Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) oraz parwovirus B19 (B19V) badane są u dawców krwi, ten pierwszy u wszystkich dawców, drugi u dawców osocza przeznaczonego do produkcji immunoglobuliny anti-D oraz anti-HBs. Genotypy HBV, których dotychczas zidentyfikowano 8, różnią się dystrybucją geograficzną oraz przebiegiem zakażenia. Opisano mutacje zlokalizowane w genie S mające charakter mutacji ucieczki i prowadzące do obniżonej reaktywności antygeny powierzchniowego z przeciwciałami m.in. w testach diagnostycznych. W przypadku B19V obecnie znane są trzy genotypy. Opisano trudności w diagnostyce genotypu 2 i 3 manifestujące się wynikami fałszywie ujemnymi oraz zaniżaniem wyników badań ilościowych DNA B19V. Przebieg zakażenia oraz epidemiologia tych genotypów jest mało poznana.*

Celem obecnego opracowania było przedstawienie wyników badania polimorfizmu wirusa B19V oraz HBV w Polsce. Szczegółowe badanie polimorfizmu HBV prowadzono w osoczu pochodzącym od dawców na różnych etapach zakażenia. Próbkę pochodziły z terytorium całego kraju. Badania genomu HBV obejmowały określenie genotypu oraz analizę specyficznych mutacji. Genotypy parwovirusa B19 badano u objawowo zakażonych pacjentów. Szczegółowo opisano przebieg zakażenia genotypami innymi niż klasyczny genotyp 1.

Materiał i metody: *Dawcy zakażeni HBV zostali zidentyfikowani w trakcie rutynowych badań przeglądowych antygeny powierzchniowego (HBsAg) oraz DNA HBV. W celu dokładnego określenia typu zakażenia oraz charakterystyki wirusologicznej badano u nich także inne markery zakażenia (antygen HBe, przeciwciała anti-HBc, anti-HBs oraz anti-HBe), oceniano ilość DNA HBV oraz, w przypadku obecności antygeny HBs, określano jego stężenie. Analizy polimorfizmu HBV dokonano w 7 próbkach pochodzących od dawców we wczesnej fazie zakażenia, w 170 próbkach od dawców z HBsAg oraz w 40 próbkach z tzw. „ukrytym” zakażeniem HBV (OBI). Genotypy HBV określano przez sekwencjonowanie, a następnie analizę filogenetyczną lub przez analizę sekwencji regionu pre-S/S za pomocą programu BLAST/genotyping. Analizie filogenetycznej poddano całe genomy (n = 53) lub sekwencje specyficznych regionów: pre-S/S oraz basic core promoter/pre-core (BCP/PC) (odpowiednio 91 i 154 próbki) dawców z HBsAg. Pacjentów zakażonych B19V identyfikowano metodą real-time PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym), która wykrywa wszystkie trzy genotypy B19V. Spośród 69 DNA B19V dodatnich pacjentów z klinik hematologicznych oraz ginekologiczno-położniczych zdiagnozowanych w latach 2004-2008 do analizy polimorfizmu wybrano 30, przede wszystkim w ostrej fazie infekcji. Badanie genotypów przeprowadzono stosując analizę sekwencji regionu NS1/VP1u. U osób zakażonych genotypem innym niż 1 zbierano kolejne próbki, analizując w nich parametry morfologii krwi obwodowej oraz wirusologiczne markery zakażenia (anti-B19V oraz DNA B19V).*

Wyniki: *Mediana wieku dawców zakażonych HBV na wczesnym etapie zakażenia wynosiła 40 lat, nie wykrywano u nich HBsAg, a jedynie DNA HBV (mediana 10,12 IU/ml, maksymalnie 140 IU/ml), u jednej osoby wykryto dodatkowo anti-HBs, anti-HBc klasy IgM oraz anti-HBe.*

Dawcy z HBsAg byli młodsi (mediana wieku 21 lat). Anty-HBs, anty-HBe oraz HBeAg wykryto odpowiednio u 5%; 92,4% oraz 10,5% dawców tej grupy. Stężenie DNA HBV wahało się między ilością niemierzalną a $3,1 \times 10^{10}$ IU/ml (mediana: $4,10 \times 10^3$ IU/ml). Dawcy z OBI byli najstarsi (mediana 47 lat), wszyscy byli z anty-HBc, u 7 dawców (18,9%) wykryto niskie stężenie anty-HBs (mediana 1,45 IU/L), u żadnego z badanych nie stwierdzono HBeAg, natomiast u 8 wykryto przeciwciała do tego antygeny (38,1%).

U polskich krwiodawców zakażonych HBV identyfikowano zakażenie trzema genotypami — A, D oraz H. Dwa pierwsze genotypy wykrywano na wszystkich trzech etapach zakażenia, genotyp H wykryto jedynie u dwóch dawców z OBI. Rozkład częstości genotypów A i D był odmienny u dawców z HBsAg i OBI. W pierwszej z wymienionych grup dominował genotyp A2 (80,5%), prawie czterokrotnie rzadziej wśród zakażonych identyfikowano genotyp D (19,5%). U osób z OBI dominował genotyp D (57,5% zakażonych), genotyp A wykrywano jedynie u 37,5% badanych. Szczegółowa analiza regionu MHR genu S u osób na wczesnym etapie zakażenia wykazała zakażenia jedynie formą dziką, u dawców na późniejszym etapie zakażenia obserwowano narastający polimorfizm na poziomie sekwencji aminokwasowych. Częstość nosicieli mutacji prowadzących do substytucji aminokwasowych w regionie MHR wynosiła odpowiednio 17,6% oraz 52,5% dawców z HBsAg oraz z OBI. Częstość nosicielstwa tego typu mutacji była większa u dawców zakażonych genotypem D niż genotypem A, zarówno u dawców z HBsAg, jak i tych z OBI. Zidentyfikowano mutacje ucieczki prowadzące do substytucji aminokwasowych utrudniających rozpoznanie HBsAg przez przeciwciała w trakcie diagnostyki metodami serologicznymi. Szczegółowa analiza filogenetyczna całych genomów pochodzących od dawców z HBsAg wykazała zakażenia podtypami A2 oraz D1 i D2. Mediana współczynnika HBsAg/HBV DNA wyrażona w IU/ml wynosiła około 1 dla obu genotypów, przy czym skrajnie niskie i skrajnie wysokie wartości obserwowano częściej dla genotypu D. Analiza regionu BCP/PC u dawców z HBsAg wykazała występowanie podwójnych mutacji 1762T/1764A w 49/125 (39,2%) sekwencji genotypu A2 oraz 6/29 (20,7%) genotypu D ($p = 0,08$). Mutacje w regionach pre-C i BCP nie korelowały ani z poziomem HBsAg, ani DNA HBV.

Analiza polimorfizmu B19V wykazała, że większość pacjentów z B19V była zakażonych genotypem 1. U dwóch osób (6,6%), u biorczyni przeszczepu nerki z ciężką anemią oraz u chorej na białaczkę z pancytopenią w następstwie chemioterapii, zidentyfikowano zakażenie genotypem 2. W obu przypadkach zakażenie związane było z wysoką wiremią. Normalizację stanu klinicznego oraz spadek poziomu DNA B19V obserwowano u pierwszej pacjentki po zmianie leczenia immunosupresyjnego, u drugiej zaś po dożylnym podaniu immunoglobulin. Pomimo poprawy parametrów klinicznych oraz wirusologicznych, DNA B19V wykrywano przez cały czas prowadzenia obserwacji. W późniejszym okresie biorczyni przeszczepu nerki zaszła w ciążę, jednak mimo przewlekłej infekcji genotypem 2 B19V nie obserwowano u niej żadnych objawów klinicznych.

Wnioski: Dobór testów diagnostycznych, ich walidacja oraz inne formy kontroli jakości badań HBV i B19V, prowadzone zarówno u krwiodawców, jak i chorych, powinny uwzględniać, oprócz najpowszechniej występujących u osób zakażonych genotypów A HBV oraz genotypu 1 B19V, także genotypy występujące rzadziej; odpowiednio, D i H oraz genotyp 2. Obecne badania nie potwierdzają całkowitego zaniku genotypu 2 B19V w Polsce, natomiast są zgodne z wcześniejszymi informacjami o występowaniu zakażenia genotypem H HBV w naszym kraju. Przebieg zakażenia genotypem 2 u chorych leczonych immunosupresyjnie jest podobny jak w przypadku zakażenia genotypem 1 B19V. U osób z genotypem D HBV stwierdzono większy, niż w przypadku genotypu A, polimorfizm w regionie kodującym epitopy kluczowe dla wiązania antygeny HBs przez przeciwciała (neutralizujące), co ma potencjalne znaczenie dla prawidłowości diagnostyki metodami serologicznymi oraz dla skuteczności profilaktyki wykorzystującej szczepienia ochronne oraz immunoglobuliny anty-HBs.

Słowa kluczowe: wirus zapalenia wątroby typu B, HBV, parwovirus B19, B19V, genotypy, mutanty, epidemiologia, dawcy krwi

Summary

Background: *Hepatitis B virus (HBV) and parvovirus B19 (B19V) are tested in blood donors; the markers of the former are screened in all donors, the DNA of the latter is tested in donor plasma for anti-D and anti-HBs immunoglobulin production. The eight HBV genotypes that have been discovered up to date differ in geographical distribution and infection course. Some mutations in gene S are called “escape mutations” and result in decreased reactivity of surface antigen with specific antibodies or even false negative results in diagnostic assays. In the case of B19V, three genotypes have been described. The difficulties related to the diagnosis of genotypes 2 and 3 manifested in false negative results and underestimation of the results of quantitative testing have been described in literature. The course of infection with these genotypes is not well understood.*

The aim of the study was to present the results of B19V and HBV polymorphism testing in Poland. Detailed analysis of HBV polymorphism was performed in plasma from donors at various stages of infection. Samples were collected from the territory of the whole country. The HBV genome study involved identification of genotype and specific mutations analysis. Parvovirus B19 genotypes were tested in symptomatic patients. The course of non-genotype 1 infections was described in detail.

Material and methods: *HBV infected donors were identified during HBsAg and DNA HBV blood donor screening. For precise discrimination of infection stage additional HBV infection markers were tested (HBe antigen, anti-HBc, anti-HBs and anti-HBe antibodies), HBV DNA level was estimated and when HBsAg was detected in the sample, we also determined the antigen load. The HBV polymorphism analysis was performed in seven donor samples in early infection stage, in 170 samples from HBsAg positive donors and in 40 donors with the so called “occult” HBV infection (OBI). The HBV genotype was determined with sequencing and subsequent phylogenetic analysis or by region pre-S/S analysis with BLAST/Genotyping software. The whole genome (n = 53) or/and specific regions pre-S/S and basic core promoter/pre-core (BCP/PC) were analysed. Patients infected with B19V were identified with real-time PCR (real time polymerase chain reaction), which detects all three B19V genotypes. In the period 2004–2008 sixty nine cases, mostly acute-phase B19V DNA positive, were identified in patients from hematological and obstetric/gynecological wards. Thirty patients were studied in greater detail and genotyping was performed by analysis of the NS1/VP1u region. Follow-up samples were collected from patients with non-genotype 1 infection. Peripheral blood morphology parameters and virological markers (anti-B19V and B19V) were analysed.*

Results: *Median donor age at early stage of HBV infection was 40; they were HBsAg negative and HBV DNA positive (median 10.12 IU/ml, maximum 140 IU/ml). In one donor, anti-HBs, anti-HBc IgM and anti-HBe were also detected. HBsAg donors were younger (median age 21). In this group we detected anti-HBs, anti-HBe and HBeAg in 5%; 92.4% and 10.5% of donors, respectively. The HBV DNA load ranged between unquantifiable and 3.1×10^{10} IU/ml (median: 4.10×10^3 IU/ml). Donors with OBI were the oldest (median age 47), all anti-HBc positive; in 7 donors a low level of anti-HBs was detected (median 1.45 IU/ml); none of the donors in this group was found HBeAg positive, in 38.1% however we detected antibodies to this antigen.*

We identified three genotypes — A, D and H in Polish HBV infected blood donors. The first two genotypes were detected in all three groups of HBV infected donors, genotype H was identified only in two donors with OBI. The distribution of A and D genotypes in HBsAg positive and OBI donors was different. In the former (HBsAg positive) group most donors were infected with genotype A2 (80.5%) while genotype D was almost four fold less frequent (19.5%). In the latter group (OBI) genotype D was most frequent (57.5%) and genotype A was identified only in 37.5% of tested donors. Detailed analysis of MHR of gene S in donors at early infection stage revealed only wild type infection. In HBsAg positive and OBI donors we observed increasing polymorphism at amino acid sequence level. The frequency of HBV donors

with amino acid substitutions in MHR was 17.6% and 52.5% of donors with HBsAg and OBI, respectively. In both groups of donors the frequency of this type of substitutions was higher in genotype D infected donors than those infected with genotype A. We identified mutations leading to amino acid substitution which obstructed the recognition of HBsAg by antibodies during diagnostics with serological methods. Detailed phylogenetic analysis of whole genomes from HBsAg positive donors revealed infections with subtypes A2, D1 and D2.

The median HBsAg/HBV DNA ratio expressed in IU/ml was approximately 1 for both genotypes, but extremely low or very high ratios appeared more frequently in genotype D infections. BCP/PC region analysis in HBsAg positive donors revealed the double mutation 1762T/1764A in 49/125 (39.2%) genotype A2 and 6/29 (20.7%) genotype D strains ($p = 0.08$). Mutations in BCP/PC region correlated neither with HBsAg nor HBV DNA levels.

The B19V polymorphism analysis revealed most samples to be infected with genotype 1. Two (6.6%) strains however were identified as genotype 2, associated with high viraemia and identified in a kidney transplant recipient with anemia and a leukemia patient with pancytopenia following chemotherapy. In both cases B19V viraemia was very high. Treatment with intravenous immunoglobulin in the former patient and a change of immunosuppression treatment in the latter, resulted in normalization of clinical parameters, and whilst viral loads fell, B19V DNA was still detectable. The kidney transplant recipient subsequently became pregnant with no clinical complications, although persistently infected with B19V genotype 2.

Conclusions: Decision to choose the appropriate diagnostic and screening tests, their validation and quality control should take into account not only the higher frequency of A genotype in HBV and genotype 1 of B19V, but also less frequent genotypes D and H and genotype 2 of respective viruses. The present study is in accordance with up to date information referring to the presence of HBV genotype H in Poland. Our observations do not confirm complete disappearance of genotype 2. in our country. The course of genotype 2 infection in immunosuppressive patients is similar to that observed for genotype 1 B19V infection. Polymorphism in the region which codes epitopes crucial for HBs antigen-binding by antibodies was observed to be higher in donors infected with genotype D HBV compared to donors infected with genotype A. This may be significant for proper diagnostics with serological methods and for effectiveness of vaccination and anti-HBs immunoglobulin prophylaxis.

Key words: hepatitis B virus, HBV, parvovirus B19, B19V, polymorphism, genotypes, mutants, variants, transmission, epidemiology, blood donors

J. Transf. Med. 2011; 2: 45–81

1. Wstęp

1.1. Badania wirusologiczne u polskich dawców krwi

Obecnie u polskich krwiodawców wykonywane są rutynowo przeglądowe badania wirusów zapalenia wątroby typu B (HBV) i typu C (HCV) oraz ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV). Metodami serologicznymi badane są przeciwciała anty-HCV, anty-HIV-1/2 oraz antygen powierzchniowy HBV (HBsAg), zaś metodami biologii molekularnej RNA HCV, DNA HBV oraz RNA HIV [1]. Dzięki badaniu kwasów nukleinowych zapobiega się przeniesieniu infekcji od dawcy w okresie,

kiedy nie jest możliwe wykrycie markerów serologicznych, we wczesnym etapie zakażenia (okienko serologiczne) lub w przypadku tzw. zakażenia ukrytego. Dodatkowo, zgodnie z zaleceniami Farmakopei Europejskiej [2–4], od 2006 roku u wszystkich dawców osocza przeznaczonego do produkcji immunoglobulin anty-RhD badane jest DNA parwowirusa B19 (B19V) metodą ilościową. W tym przypadku do produkcji nie dopuszcza się osocza zawierającego ilość B19V, która może spowodować przekroczenie dopuszczalnego progu 10^4 IU/ml w puli produkcyjnej. Co więcej, takim samym badaniami jest poddawane osocze do produkcji immunoglobuliny anty-HBs [1].

1.2. Znaczenie badania polimorfizmu wirusów przenoszonych przez krew

Rozwój technik biologii molekularnej umożliwił wprowadzenie bardzo czułych metod bezpośrednio wykrywania wirusów przenoszonych drogą krwi. Dodatkowo, dzięki tej metodyce możliwe jest gromadzenie danych na temat polimorfizmu, zarówno na poziomie genomów, jak i białek. Udowodniono, że polimorfizm wirusów przenoszonych drogą krwi ma istotne znaczenie kliniczne i diagnostyczne. Zidentyfikowano na przykład wiele tak zwanych „mutantów ucieczki”. W przypadku HBV mogą one przełamywać oporność indukowaną szczepieniami czy związaną z immunoglobulinami anti-HBs podawanymi profilaktycznie, ale także mogą nie być wykryte testami serologicznymi przeznaczonymi do wykrywania antygeny powierzchniowego wirusa HBV (HBsAg) [5–7].

W przypadku parwowirusa B19 niektóre testy NAT (*nucleic acid testing*) nie wykrywają lub zaniżają ilość genotypu 2 i 3 oraz niektórych wariantów genotypu 1 [8–12].

W ostatnim czasie opisano przypadek zakażenia wirusem HIV w wyniku przetoczenia zakażonego koncentratu krwinek czerwonych, mimo uprzedniego badania dawcy metodą NAT. Fałszywie ujemny wynik badania przeglądowego był związany z mutacjami w regionie *gag* genomu, do którego został zaprojektowany test przeglądowy [13]. W sekwencji komplementarnej do sondy oraz primera antysensownego stwierdzono odpowiednio jedną oraz dwie niezgodności. Podobną sytuację opisano we Włoszech; u dawcy z przeciwciałami anti-HIV, których swoistość została potwierdzona w badaniach testem typu Western Blot, uzyskano fałszywie ujemny wynik badania przeglądowego NAT. W tym przypadku brak wykrywania RNA HIV był związany z polimorfizmem nieznanego dotychczas formy zrekombinowanej B/F. W badaniach chorych zakażonych HIV nowopoznana forma zrekombinowana została wykryta u 11/553 chorych. W ich przypadku, rutynowe testy również zaniżały ilość RNA wirusa nawet o 5 rzędów wielkości [14].

Przytoczone przykłady pokazują, że wiedza dotycząca polimorfizmu wirusów jest istotna dla bezpieczeństwa przetoczeń i musi być brana pod uwagę przy konstruowaniu, a następnie doborze testów przeglądowych. Eksperti WHO zalecają, aby ocena testów dopuszczanych na danym terytorium uwzględniała możliwie najpełniejszą wiedzę o polimorfizmach wirusów występujących lokalnie [15].

Dotychczas szczegółowo opisano epidemiologię molekularną wirusa HCV w Polsce na podstawie badań zakażonych dawców krwi oraz chorych.

Zwrócono w nich szczególną uwagę na zmiany zachodzące w ostatnich latach w częstości poszczególnych genotypów [16–18]. W obecnej pracy skoncentrowano się na polimorfizmie parwowirusa B19V i HBV. Polimorfizm pierwszego z wirusów nie był dotychczas w Polsce badany; w przypadku HBV dotychczasowa wiedza ma charakter fragmentaryczny i dotyczy przede wszystkim występowania genotypów HBV w niewielkich grupach chorych badanych lokalnie [19–23]. W obecnej pracy analizowano występowanie genotypów na terenie całego kraju oraz przeprowadzono szczegółowe badanie wielu mutacji.

1.3. Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV)

1.3.1. Biologia molekularna HBV

Wirus zapalenia wątroby typu B jest częściowo dwuniciowym wirusem DNA należącym do rodziny *Hepadnaviridae*, rodzaj *Orthohepadnavirus*. Genom wirusa o długości około 3,2 kb koduje 4 otwarte ramki odczytu (ORF, *open reading frame*) — S, C, P, i X, które obejmują odpowiednio geny pre-S/S (trzy białka otoczki), pre-C/C proteina prekursorowa preCore, białko rdzeniowe HBc oraz białko e), gen P (polimeraza DNA) oraz gen X (białko X). ORF S i X częściowo pokrywają się z najbardziej rozległą ORF P. Białko rdzeniowe (HBcAg), trzy glikoproteiny otoczki (HBsAg, gp36 i gp 42) oraz wirusowa polimeraza DNA tworzą dojrzałą cząsteczkę wirusa. Region Pre S/S koduje trzy białka otoczki — małe (S, HBsAg), średnie (M, preS2) oraz duże (L, preS1). HBsAg jest głównym białkiem otoczki, składającym się z 226 aminokwasów i zawierającym regiony odpowiedzialne za przyłączenie się cząsteczek wirusowych do błony komórkowej oraz epitopy rozpoznawane przez przeciwciała. Kluczowe znaczenie mają epitopy obecne w antygenowej determinancie α HBsAg wspólnej dla wszystkich genotypów. Skuteczność oddziaływań pomiędzy przeciwciałami, a tą determinantą warunkuje ograniczenie zakażenia u osób zakażonych oraz efekt ochronny przeciwciał wyprodukowanych w następstwie szczepienia [24].

Gen polimerazy koduje duże białko o istotnym znaczeniu w składaniu cząsteczek wirusa i replikowaniu wirusowego DNA, ma własność polimerazy DNA, posiadającą dodatkowo aktywność odwrotnej transkryptazy i RNazy H. Białko X posiada własności transaktywujące, prawdopodobnie odgrywa istotną rolę w karcinogenezie komórek wątroby i nie jest elementem wirionu. Białko e (HBeAg) zawiera sekwencje aminokwasowe antygeny c, jednak jest antygenem rozpuszczalnym, wydzielanym przez zakażone komórki [25].

1.3.1.1. Genotypy, podtypy, warianty oraz typy serologiczne

Polimorfizm wirusa HBV jest ściśle związany z mechanizmem replikacji, który jest unikalny wśród wirusów DNA. W jego przebiegu, wirusowa odwrotna transkryptaza powiela genom, wytwarzając jako pośredni substrat cząsteczki RNA. Aktywność odwrotnej transkryptazy HBV, podobnie jak w przypadku innych wirusów, których replikacja jest uzależniona od tego typu aktywności enzymatycznej, charakteryzuje się brakiem własności korekcyjnych. W konsekwencji, częstość mutacji obserwowana w genomie HBV jest nawet 10-krotnie wyższa niż w przypadku innych wirusów DNA. Szacuje się, że w ciągu roku dochodzi do $1,4-7,9 \times 10^{-5}$ podstawień/miejsce [26, 27]. Drugim istotnym choć mało znanym źródłem zmienności jest rekombinacja [28, 29].

Na podstawie analizy sekwencji całych genomów wyodrębniono dotychczas 8 genotypów wirusa HBV (A–H), które różnią się o ponad 8% oraz liczne podtypy różniące się przynajmniej o 4% [30] (tab. 1). W ostatnim czasie zidentyfikowano następne formy polimorficzne. Sugeruje się, aby wyodrębnić kolejny dziewiąty genotyp I [31, 32] oraz nowe podtypy [33–35]. Największą tendencją do rekombinacji wykazują genotypy A oraz C. Zidentyfikowano miejsca w genomie, w których najczęściej dochodzi do wymiany materiału genetycznego pomiędzy różnymi genomami (*breakpoint hot spots*). Najczęściej identyfikowane są rekombinanty B/C (Wschodnia i Południowa Azja) oraz A/D (Południowa Afryka oraz Włochy) [29].

Wiedza dotycząca genotypów HBV ma nadal jeszcze charakter fragmentaryczny, pozwala jednak stwierdzić, że poszczególne genotypy charakteryzują się specyficzną dystrybucją geograficzną, dominującymi drogami przenoszenia i odmiennym przebiegiem zakażenia. Genotypy różnią się także wrażliwością na leki przeciwwirusowe (tab. 2) [25, 30, 36, 37].

Zidentyfikowano wiele mutantów charakteryzujących się zwiększoną zakaźnością, podwyższonym tempem replikacji, opornością na leki przeciwwirusowe oraz zmienionymi epitopami antygenowymi. Mutacje w podstawowym rdzeniu promotora (BCP, *the basal core promotor*) w pozycji nukleotydowej (nt.) 1762 i nt. 1764 [38] oraz mutacja prowadząca do powstania kodonu stop w regionie *pre-core* w pozycji nukleotydowej (nt.) 1896 [39] zmniejszają lub nawet całkowicie hamują ekspresję antygeny e wirusa HBV (HBeAg). Jednocześnie ich obecność koreluje z aktywacją odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu. Sformułowano także hipotezę, że mutacje w regionie BCP wpływają na replikację wirusa ze względu na kontrolę produkcji pregenomowego RNA. Jednak badania nad wpływem mutacji w tym regionie przynosiły dotychczas niejednoznaczne wyniki [40–42]. Ostatnio wykazano *in vitro*, że mutacje 1766T/1768A, 1762T/1764A/1766T oraz 1753C/1762T/1764A wiążą się ze zwiększoną replikacją HBV [43].

Szczególne znaczenie mają mutacje w genie kodującym białko powierzchniowe S, zwłaszcza zmieniające sekwencje aminokwasowe małej proteiny HBs w głównym regionie hydrofilowym

Tabela 1. Typy i warianty polimorficzne wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV)

Table 1. Polymorphic forms and variants of hepatitis B virus (HBV)

Typ/wariant	Kryteria	Znane typy/warianty
Genotypy*	Różnice 8–15% między sekwencjami nukleotydowymi całych genomów	A, B, C, D, E, F, G, H, I**
Podtypy	Różnice < 4% między sekwencjami nukleotydowymi całych genomów	A1–A7; B1–B6, C1–C7, D1–D7, F1–F4
Podtypy HBsAg	Polimorfizm w określonych pozycjach sekwencji aminokwasowej determinanty a: 122: d (lizyna) lub y (arginina) 160: w (lizyna) lub r (arginina) 127: w3 (treonina) lub w4 (leucyna) lub prolina w1–w3 159: w1 (alanina) lub inny aminokwas, wtedy 140: w2 (inne niż seryna) lub w4 (seryna)	adw2, adw3, adw4, adr, ayw1–4, ayr
Warianty	Mutacje w sekwencji nukleotydowej prowadzące do istotnych zmian w strukturze białek (np. substytucji aa) lub do zmian funkcjonalnych w elementach regulatorowych	Przykładowo mutanty ucieczki w MHR regionu pre-S/S, np. G145R mutanty regionu BC/PC takie jak A1762T/G1764A, G1896A i inne

*dotatkowo wyróżnia się formy zrekombinowane genotypów; dotychczas najczęściej identyfikowano rekombinanty B/C i A/D [29]

**postulowane jest wydzielenie oddzielnego dziewiątego genotypu I

Tabela 2. Ogólna charakterystyka genotypów wirusa zapalenia wątroby typu B, na podstawie J.-P. Allain 2007 oraz McMahon B. 2008 [36, 37]**Table 2.** General characteristics of genotypes of hepatitis B virus, based on J.-P. Allain 2007; and McMahon B. 2008 [36, 37]

Genotyp	Występowanie	Najczęstsze drogi przenoszenia	Przykładowe korelacje z chorobami wątroby
A	Afryka Południowa, Europa, Ameryka Północna	Seksualna IVDU	A1 — HCC w młodym wieku A2 — HCC i marskość wątroby u starszych osób
B	Japonia, Azja Wschodnia,	Wertykalna	B1 — HCC i marskość wątroby u starszych osób, B2–5 HCC i marskość wątroby w młodym wieku
C	Chiny, Korea, Azja Południowa	Wertykalna	C1 i C2 — wysokie ryzyko HCC
D	Europa, Basen Morza Śródziemnego, Rosja, Bliski Wschód, Indie	Wertykalna Seksualna, szpitalne	Przewlekłe zapalenie wątroby i marskość wątroby
E	Afryka	Szpitalne, horyzontalne	Niebadane
F	Ameryka Centralna i Południowa, Alaska	Wertykalna seksualna	F1 — HCC u młodych osób, F2–3 — współzakażenie HDV — ryzyko piorunującego zapalenia wątroby
G	Afryka Zachodnia, Stany Zjednoczone, Wietnam, Europa Południowa		Zwiększone ryzyko ostrego zapalenia wątroby, włóknienie wątroby (<i>liver fibrosis</i>) i HCC
H	Ameryka Środkowa, Kalifornia		Niebadane

(MHR, *the major hydrophilic region*), obejmującym sekwencje aminokwasowe od pozycji 99 do 170. Najbardziej immunogenne determinanty antygenowe zlokalizowane są w pozycji aa 124–147. Struktura antygenowa epitopów zależy między innymi od wiązań dwusiarczkowych między cysteinami zlokalizowanymi w „pętli antygenowej”. Zmienność aminokwasów w pozycjach 122, 127, 140, 159 i 160 determinuje serotypy HBV [44]. Substytucje aminokwasowe w regionie MHR mogą prowadzić do nieskuteczności zarówno czynnej, jak i biernej immunoprofilaktyki zakażeń HBV prowadzonej odpowiednio przez szczepienia oraz podawanie immunoglobulin (HBIG). Niektóre z takich wariantów nie są wykrywane lub ich reaktywność jest obniżona w badaniach HBsAg testami serologicznymi [25]. Jedną z najlepiej poznanych mutacji tego typu jest mutacja prowadząca do substytucji glicyny przez argininę w pozycji 145. Jej występowanie stwierdzono w wielu krajach, niemal na wszystkich kontynentach. Identyfikowana była zarówno u osób uprzednio szczepionych, jak tych, którym podawano profilaktycznie swoiste immunoglobuliny. Jednocześnie obserwowano bardzo istotne trudności związane z diagnostyką — antygeny zmienionego wirusa nie wykrywano w badaniach prowadzonych różnymi testami serologicznymi. Wykazano, że wariant ten może pojawić się zarówno w trakcie zakażenia jako wynik presji immunologicznej, jak również może

zostać przeniesiony, co wskazuje na jego dużą stabilność [45].

Z jednej strony produkowane obecnie szczepionki i testy diagnostyczne uwzględniają postęp wiedzy dotyczącej wariantów, z drugiej zaś opisywane są kolejne, dotychczas nieznanne warianty, których znaczenie kliniczne i diagnostyczne wynika z kombinacji wielu substytucji aminokwasowych. Biologiczne i kliniczne znaczenie mutacji innych regionów pre-S/S nie jest dobrze poznane.

Zidentyfikowano wiele mutacji w genie kodującym polimerazę HBV, które korelują z lekoopornością na leki przeciwwirusowe (lamiwudynę, adefowir, entekawir); są one zlokalizowane w domenach katalitycznych polimerazy [46].

1.3.2. Przebieg zakażenia HBV

Prawdopodobieństwo rozwinięcia przewlekłego zakażenia HBV zależy od tego kiedy do zakażenia doszło. Najwyższe ryzyko jest wówczas, gdy do infekcji dochodzi drogą perinatalną (90%), nieco mniejsze u dzieci, których układ odpornościowy nie jest jeszcze w pełni rozwinięty (20–30%), a najmniejsze występuje u dorosłych osób (<1%). Przebieg kliniczny zakażenia HBV jest związany z pojawianiem się markerów infekcji. Szacuje się, że średnio 21 dni od momentu zakażenia możliwe jest wykrycie DNA HBV przy zastosowaniu bardzo czułych metod diagnostycznych opartych na amplifikacji

cji kwasów nukleinowych. Po kolejnych dwóch tygodniach (średnio 36 dni od zakażenia) jest wykrywany HBsAg, za pomocą najczulszych dostępnych obecnie testów serologicznych [47]. W pierwszych dniach obecności wykrywalnego HBsAg pojawiają się przeciwciała skierowane do antygeny rdzeniowego, najpierw klasy IgM, następnie IgG. Obecnie wyróżnia się cztery fazy przewlekłego zakażenia HBV [48, 49]. W fazie tolerancji immunologicznej wykrywany jest antygen HBe, poziom DNA HBV w osoczu jest wówczas wysoki ($>10^4$ IU/ml), a poziom aktywności ALT utrzymuje się w granicach wartości referencyjnych lub jest lekko podwyższony; w wątrobie nie obserwuje się istotnych zmian histologicznych. Ta faza trwa 10–30 lat u osób zakażonych na drodze perinatalnej, lecz jest znacznie skrócona lub w ogóle może jej nie być u osób zakażonych w dzieciństwie lub w okresie dorosłym. W następnej fazie ograniczania zakażenia (*immune clearance*), układ odpornościowy zakażonego organizmu atakuje wirusa i zakażone przez niego komórki, czemu towarzyszy wahający się, ale sukcesywnie zmniejszający poziom DNA HBV, podwyższony poziom aktywności ALT połączony ze zmianami w obrazie histologicznym wątroby (najczęściej włóknienie, *fibrosis*). W tym okresie poziom DNA HBV w osoczu zazwyczaj przekracza 20 000 IU/ml, jest wykrywany antygen HBe. Etap ten prowadzi do fazy nieaktywnego nosicielstwa charakteryzującego się brakiem antygeny HBe i obecnością przeciwciał do tego antygeny, poziom DNA HBV zazwyczaj nie przekracza 2000 IU/ml, aktywność ALT utrzymuje się w granicach normy, zaś obraz histologiczny wątroby jest pozbawiony cech zapalnych. U tych osób po wielu latach zakażenia zanika antygen HBs, przy czym można również obserwować pojawienie się/fluktuację poziomu przeciwciał anti-HBs i niski poziom DNA HBV w osoczu/wątrobie. Jest to stan określany jako ukryte zakażenie HBV (OBI, *occult hepatitis B infection* [50, 51]. W odpowiednich warunkach w szczególności u HBeAg ujemnych/anty-HBeAg dodatnich nosicieli wirusa ten etap zakażenia może przejść w reaktywację charakteryzującą się rosnącym poziomem DNA HBV, czemu towarzyszy podwyższony poziom aktywności ALT oraz zmiany histopatologiczne w wątrobie.

Przewlekłe zakażenie HBV może prowadzić do marskości wątroby oraz nowotworu wątroby (HCC). Proces ten zależy od wielu czynników zarówno po stronie zakażonego (wiek, płeć, alkoholizm i inne czynniki, które są obecnie badane), jak również wirusa (poziom replikacji wirusa, genotyp, warianty) oraz od współzakażenia innymi wirusami takimi jak HCV, HDV, HIV [48, 49].

Ocenia się, że prawie 1/3 przypadków zakażenia HBV przebiega bezobjawowo. Kolejnym 30% infekcji towarzyszą małoswoiste objawy grypopodobne, u pozostałych obserwuje się żółtaczkę. Szacuje się, że około 3% zakażonych przechodzi ostrą fazę piorunującą, z kolei nosiciele, którzy nie wyeliminowali zakażenia, są zagrożeni rozwojem poważnych schorzeń wątroby [48, 49].

1.3.3. Epidemiologia HBV

Szacuje się, że prawie 1/3 populacji naszego globu (około 2 miliardy osób) przeszła zakażenie HBV, a 400 milionów jest przewlekłe zakażonych tym wirusem i należy do grupy podwyższonego ryzyka zachorowania na nowotwór wątroby (HCC, *hepatocellular carcinoma*) oraz marskość wątroby (*cirrosis*). W wyniku zakażenia HBV, z powodu tych dwóch chorób co roku umiera 320 000 ludzi [52].

Na początku lat 80. XX wieku zapadalność na zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B w Polsce wynosiła 45 przypadków/100 000 mieszkańców/rok i była najwyższa w Europie [53]. Analiza epidemiologiczna wykrywania HBsAg u dawców krwi w latach 1995–2004 wykazała, że około 0,8% pierwszorazowych dawców jest nosicielami HBsAg. W analizowanym okresie obserwowano spadek częstości wykrywania tego markera wśród dawców zarówno pierwszorazowych, jak i wielokrotnych. W tej drugiej grupie dawców tendencja ta była istotnie silniej zaznaczona i wynosiła 20,7%/rok (spadek z 0,088% w roku 1995 do 0,017% w 2004 roku) wobec 5,4%/rok u dawców pierwszorazowych (spadek z 0,79% do 0,67% w tym samym okresie) [54]. Badania losowo wybranych dawców w RCKiK Kraków wykazały, że 8% z nich jest nosicielami przeciwciał skierowanych do antygeny rdzeniowego HBV (anty-HBc), co świadczy o przebytych zakażeniu lub ekspozycji [55]. Jednocześnie w populacji występującej grupy chorych z wyższą częstością markerów zakażenia HBV. Przykładowo, HBsAg jest wykrywany u 8,7% dorosłych chorych na hemofilię i 3,42% chorych poddawanych hemodializom, zaś częstość anti-HBc wynosi odpowiednio 68% i 32,7% [56, 57].

Sytuacja epidemiologiczna była przyczyną stopniowego wprowadzania szerokiego programu szczepień w latach 90. oraz rozpoczęcia w 2005 roku badań przeglądowych DNA HBV u wszystkich dawców krwi [58]. Badanie dawców na obecność DNA HBV pozwoliło na identyfikację dawców z tak zwanym „zakażeniem ukrytym” (HBsAg–/DNA HBV+). Opublikowano serologiczną i molekularną charakterystykę zakażenia HBV u takich dawców — w większości przypadków są oni anti-HBc-dodatni. W ten sposób są identyfikowani także dawcy na wczesnym

etapie zakażenia (HBsAg-/DNA HBV+ zazwyczaj bez markerów serologicznych) dzięki czemu unika się przetoczeń obciążonych dużym ryzykiem przeniesienia zakażenia na biorcę [58, 59].

Wspomniane akcje szczepień, doskonalenie metod badania HBV u dawców krwi oraz dodatkowo ulepszenie metod sterylizacji sprzętu medycznego i coraz powszechniejsze używanie sprzętu jednorazowego użytku przyczyniły się do radykalnego zmniejszenia w Polsce zapadalności na WZW typu B do 3,51 przypadków/100 000 mieszkańców w roku 2008 [60].

1.4. Parwovirus B19 (B19V)

1.4.1. Biologia molekularna oraz polimorfizm B19V

Parwovirus B19 (B19V) należy do rodziny *Parvoviridae* rodzaju *Erythrovirus*, jest jednym z najmniejszych znanych wirusów zakażających człowieka [61]. Cząsteczki wirusa o średnicy 22–24 nm zawierają jednoniciowe DNA (ssDNA) o długości około 5600 nukleotydów. Na obu końcach genomu B19V występują identyczne fragmenty z odwróconymi powtórzonymi sekwencjami nukleotydowymi, które tworzą tak zwaną strukturę szpilki do włosów. Zidentyfikowano sekwencję jednego promotora — p6, który reguluje syntezę dziewięciu transkryptów RNA kodujących białko niestrukturalne (NS1), dwa białka kapsydu (VP1 i VP2) oraz dodatkowe małe białka o nieznannej funkcji. Choć białko VP2 jest głównym składnikiem kapsydu i stanowi około 95% z 60 kapsomerów tworzących cząsteczkę wirusa o ikozahedralnej strukturze, to jednak występujące w mniejszości VP1 jest nosicielem najbardziej immunogennych determinant antygenowych. Białko NS1 posiada właściwość wiązania się z DNA oraz właściwość ATPazy i helikazy. Jest także zaangażowane w proces transkrypcji i ma właściwości cytotoksyczne. Brak otoczki tłumaczy wyjątkową oporność wirusa na czynniki fizyczne, takie jak wysoka i niska temperatura, stabilność niezależnie od pH środowiska, odporność na rozpuszczalniki i detergenty oraz na wysychanie. Patogenność B19V jest zdeterminowana przez fakt, że receptorem dla wirusa jest antygen P (globozyd) obecny na komórkach linii erytrocytarnych (od erytroblastów po dojrzałe erytrocyty), na megakariocytach, na błonie maziowej, na komórkach mięśnia sercowego i śródbłonka oraz na syncytiotrofoblastach i cytotrofoblastach. Za powinowactwo do antygeny P odpowiada wirusowe białko VP2. Większość populacji jest nosicielem globozydu, jednak u 1/10 000 osób nie dochodzi do ekspresji tego antygeny i nigdy nie ulegają one zakażeniu. Wykazano wysoką koncen-

trację globozydu w łożysku, szczególnie w I połowie ciąży, co prawdopodobnie warunkuje efektywną transmisję wirusa na dziecko w przypadku zakażenia u matki. Żeby doszło do pełnej replikacji, konieczne są nie tylko odpowiednie molekuly pełniące rolę receptora, ale także niezróżnicowane, szybko dzielące się komórki. Tego typu komórki obecne są przede wszystkim w szpiku, w wątrobie i krwi płodowej [62–64].

Do niedawna uznawano B19V za wirusa mało polimorficznego, gdyż znano jedynie różniące się zaledwie o 1–2% sekwencje genomów różnych szczepów, bardzo podobnych do prototypowego genotypu 1. Dopiero w latach 90. XX wieku zidentyfikowano kolejne genotypy znacząco różniące się od formy klasycznej. Dotychczas zidentyfikowano trzy główne genotypy B19V [65–67] oraz wyróżniono wiele podtypów [68–70]. Genotyp 1 był wykrywany na całym świecie; natomiast dane dotyczące epidemiologii genotypów 2 i 3 są fragmentaryczne. Na podstawie ograniczonej liczby publikacji uważa się, że wszystkie trzy genotypy mają podobne właściwości biologiczne i znaczenie kliniczne [71–73]. Jednocześnie wielokrotnie opisywano trudności w wykrywaniu genotypów 2 i 3 metodą NAT jako wynik polimorfizmu wirusa na poziomie genomu. Obserwowano zaniżanie ilości wirusa w badaniach ilościowych DNA B19V oraz uzyskiwanie wyników fałszywie ujemnych [8–12, 74]. Baylis i wsp. [74] wykazali, że metoda *real-time* PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym) opisana uprzednio przez Aberham i wsp. [75], a stosowana do badania DNA B19V w osoczu przeznaczonym do frakcjonowania, pozwala na poprawną ocenę ilości materiału genetycznego B19V w standardzie międzynarodowym (NIBSC 99/800) zakażonym genotypem 1 oraz genotypu 2 i 3 reprezentowanych przez izolaty, odpowiednio, A6 [66] i V9 [65]. Jednak w przypadku izolatu D91.1 [67] sklasyfikowanego jako inny podtyp genotypu 3, w trakcie amplifikacji metodą *real-time* PCR obserwowano opóźnienie pojawienia się sygnału fluorescencyjnego, co powodowało zaniżanie wyniku ilościowego i mogło prowadzić do wyników fałszywie ujemnych w próbkach z niską wiremią. Przyczyną trudności w prawidłowym pomiarze ilości wirusa były niezgodności między sekwencją sondy typu TaqMan, a docelową sekwencją zlokalizowaną w genie VP1. W przypadku genotypu 1 sonda była w pełni zgodna z odpowiednim fragmentem sekwencji genomu wirusa. W specyficznym fragmencie genomu genotypów 2 i 3 reprezentowanych przez szczepy A6 i V9 występowały odpowiednio jedna i trzy niezgodności, co nie miało praktycznego znaczenia dla ich wy-

krywania oraz pomiaru ilości DNA wirusa. W przypadku D91.1 było ich aż cztery i obniżały efektywność przyłączenia sondy do matrycy [74]. W kolejnych trzech publikacjach opisano zasadnicze trudności w trakcie badania genotypów B19V przy użyciu jednego z dostępnych testów komercyjnych [8, 9, 11]. W tym teście primery i sonda zaprojektowane zostały do regionu genu NS1. Koppelman i wsp. [11] zidentyfikowali aż sześć różnic między sekwencją 46-nukleotydowej sondy a odpowiednim fragmentem genomu genotypów 2 i 3 oraz dodatkowe niezgodności w obrębie sekwencji primerów. Opisali także wariant genotypu 1, z pojedynczą mutacją w sekwencji, do której zaprojektowano sondę innego testu *real-time* PCR typu *home made*. Stwierdzona niezgodność wprowadzała brak stabilności oddziaływań z matrycą prowadząc do zaniżania wyniku ilościowego uzyskiwanego tym testem o dwa rzędy wielkości [11].

1.4.2. Przebieg zakażenia B19V

Ludzki parwovirus B19 występuje na całym świecie. Infekcja przebiega często bezobjawowo lub towarzyszą jej mało swoiste i przemijające objawy grypopodobne. W niektórych przypadkach, w trakcie zakażenia obserwowane są: rumień zakaźny (przede wszystkim u dzieci), artropatia (choroba reumatyczna) u dorosłych, nieimmunologiczny obrzęk płodu, obumarcie płodu oraz inne komplikacje w trakcie ciąży, przełom aplastyczny u osób ze zwiększoną erytropoezą, anemia u chorych z osłabioną odpornością. W trakcie zakażenia B19V opisywane są sporadyczne przypadki zapalenia wątroby, mięśnia sercowego, trombocytopenii, neutropenii [62–64, 76].

U osób z prawidłową odpornością koncentracja wirusa gwałtownie rośnie w pierwszym tygodniu zakażenia, przekraczając nawet 1×10^{12} geq/ml. Wysokiej wirerii może towarzyszyć gorączka, złe samopoczucie, bóle mięśni, świąd, zaś w badaniu morfologii krwi obwodowej można stwierdzić nieistotne klinicznie obniżenie liczby limfocytów, neutrocytów, płytek, a także przejściowy spadek stężenia hemoglobiny i liczby retikulocytów. Odporność humoralna odgrywa zasadniczą rolę w ograniczeniu zakażenia. Po kolejnych 7–14 dniach pojawiają się swoiste przeciwciała klasy M, a w trakcie trzeciego tygodnia, IgG. Wzrostowi koncentracji przeciwciał towarzyszy spadek stężenia wirusa oraz szereg objawów — najczęściej wysypka, świąd oraz bóle stawów. W późniejszym czasie poziom przeciwciał spada, są one jednak wykrywane przez okres nawet 6 miesięcy w przypadku IgM i przez lata dla IgG [62–64, 77]. Przez wiele lat uważano, że przewle-

kłe zakażenie B19V jest zjawiskiem wyjątkowym ze względu na silne działanie neutralizujące przeciwciał. Jednak ostatnio wykazano, że wirusowe DNA obecne jest we krwi obwodowej immunokompetentnych osób nawet przez wiele lat, czemu towarzyszy obecność specyficznych IgG. Wirus może także przetrwać w szpiku kostnym, błonie maziowej, skórze oraz w innych tkankach [78].

1.4.3. Epidemiologia B19V

Powszechne występowanie B19V jest związane z przenoszeniem drogą kropelkową do układu oddechowego. Zakażenie przenoszone jest także z matki na dziecko w okresie płodowym oraz tuż po narodzeniu [62–64]. Udowodniono przenoszenie zakażenia przez transfuzję krwi i jej składników (osocze, produkty osoczo pochodne, płytki krwi, koncentraty krwinek czerwonych) [79–85], przez zakażony szpik kostny w trakcie jego przeszczepiania [86] oraz w trakcie przeszczepiania narządów litych, na przykład nerki [87].

Przeciwciała świadczące o przebyłym zakażeniu są wykrywane u większości osób w populacji, ich częstość rośnie wraz z wiekiem i osiąga 80% u 40-latków [88, 89]. W Polsce odsetek kobiet w wieku reprodukcyjnym podatnych na zakażenie B19V został oszacowany na 36,8%, zaś ryzyko zakażenia B19V w tej grupie na 1,58% [89]. Częstość wykrywania markerów zakażenia B19V — swoistych przeciwciał oraz DNA B19V — jest podwyższona w niektórych grupach chorych np. u chorych na hemofilię [90], którzy ze względu na intensywne leczenie krwią i jej składnikami są bardziej narażeni na zakażenie. Podobnie jest u kobiet z nieimmunologicznym obrzękiem płodu, co jest związane z faktem, że u części z nich chorobę wywołuje B19V [90–92].

2. Cele

Analiza polimorfizmu wirusów przenoszonych przez krew w Polsce:

- A. HBV
 - I. Ocena częstości występowania genotypów HBV u dawców krwi w Polsce.
 - II. Porównanie genotypów oraz polimorfizmu regionu MHR HBV na różnych etapach zakażenia.
 - III. Szczegółowa charakterystyka wybranych mutacji w genomie HBV.
- B. Parwovirusa B19
 - I. Ocena polimorfizmu wirusa w próbkach klinicznych.
 - II. Szczegółowa analiza zakażenia formami polimorficznymi innymi niż genotyp 1.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

3.1.1. Dawcy zakażenia HBV

Analizą objęto dawców, u których w trakcie badań przeglądowych zidentyfikowano HBV na różnych etapach zakażenia: u 7 dawców stwierdzono wczesne stadium zakażenia (grupa I), kolejną kategorię stanowiło 170 HBsAg-dodatnich pierwszorazowych dawców krwi (grupa II), u dalszych 40 stwierdzono tak zwane ukryte zakażenie (grupa III, OBI). Wszyscy byli poddani badaniom przeglądowymi testami serologicznymi na obecność HBsAg — Hepanostika HBs-Ag Ultra (BioMerieux, Francja) lub ORTHO Antibody to HBsAg ELISA Test System 3 (Ortho-Clinical Diagnostics, Stany Zjednoczone).

Próbki od dawców z HBsAg zostały pobrane w 2006 roku, w 17 regionalnych centrach krwiodawstwa (liczbę próbek podano w nawiasach): w Bydgoszczy (10), Gdańsku (10), Katowicach (10), Kielcach (6), Krakowie (10), Łodzi (10), Olsztynie (12), Opolu (10), Poznaniu (10), Raciborzu (10), Radomiu (2), Rzeszowie (10), Słupsku (20), Szczecinie (10), Wałbrzychu (10), Wrocławiu (10) oraz w Zielonej Górze (10). Do momentu badania próbki przechowywano w temperaturze poniżej -20°C . Zgodnie z Medycznymi Zasadami obowiązującymi Regionalne Centra Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa [1] dawca jest uznany za nosiciela HBsAg, jeśli uzyskano reaktywny wynik badania przeglądowego oraz przynajmniej jednego z dwóch powtórzeń wykonanych tym samym testem serologicznym, a następnie potwierdzano swoistość w teście neutralizacji lub przez stwierdzenie obecności DNA HBV.

Liczbę 47 próbek osocza dawców, u których wykryto DNA HBV, a nie stwierdzono HBsAg, zidentyfikowano w trakcie badań przeglądowych metodami biologii molekularnej prowadzonych w Regionalnych Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w latach 2007–2008, w pojedynczych donacjach metodą TMA (Procleix Ultrio, GenProbe/Chiron, Emeryville, Stany Zjednoczone) lub metodą PCR (Cobas Amliscreen Tests, Roche Molecular Systems, Branchburg, Stany Zjednoczone) w pulach osocza od 24 dawców do 2007 roku lub w pulach po 6 donacji, w okresie późniejszym. Próbki przechowywano w temperaturze -80°C . Sposób klasyfikacji jako zakażenia WP lub OBI został szczegółowo opisany wcześniej [58].

3.1.2 Pacjenci zakażenia B19V

W latach 2004–2008, w Pracowni Biologii Molekularnej Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Trans-

fuzjologii w Warszawie (IHiT) wykryto DNA B19V u 69 pacjentów klinik hematologicznych oraz ginekologiczno-położniczych, których próbki zostały skierowane na badania diagnostyczne na obecność B19V. Badaniami polimorfizmu objęto 30 pacjentów z DNA B19V, dla których dysponowano odpowiednią objętością osocza. 19 pacjentów włączonych do badań miało obniżoną odporność.

3.2. Metody

3.2.1. Charakterystyka molekularna HBV

DNA HBV izolowano z osocza metodą kolumnkową QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy), High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostics) lub easyMag (bioMerieux, Boxtel, Holandia) z odpowiednio 200 μl , 500 μl lub 1000 μl osocza, zgodnie z zaleceniami producenta. Ilość DNA wirusa badano QPCR, stosując metodę TaqMan i sondy wyznakowane na końcu 5' barwnikiem Cy5, a na końcu 3' Black Hole Quencher 2 (BHQ-2) [93].

Metodą *nested* PCR (gniazdowa reakcja łańcuchowa polimerazy) amplifikowano całe genomy HBV (~3150 bp), region pre-S/S (~1190 bp), ~450 bp genu S obejmujące pętlę antygenową oraz ~300 bp regionu *precore* oraz podstawowego promotora genu kodującego białko rdzenia (*basal core promoter/precore* [BCP/PC] region) [94]. Produkt PCR sekwencjonowano metodą bezpośrednią. Analizę filogenetyczną otrzymanych sekwencji wykonywano programem PAUP, stosując algorytm łączenia najbliższych sąsiadów (*neighbour-joining*) oraz dwuparametrowy szacunek odległości algorytmem Kiury, zgodnie z metodyką opisaną wcześniej [93, 94].

U części dawców z OBI oraz WP ilość DNA HBV określano metodą RealArt HBV RG PCR Kit (Artus GmbH, Hamburg, Niemcy), natomiast genotypowanie oraz analizę regionu MHR prowadzono przez sekwencjonowanie fragmentu o długości około 500 bp [95]. W tym przypadku do identyfikacji genotypu wykorzystywano program Blast <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi> oraz *Genotyping* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi> [96].

Jako sekwencje referencyjne wykorzystano te zdeponowane w bazie sekwencji nukleotydowych GenBank, dla podtypu A1 — M57663, AY233290, AY934772, AY934773; A2 — AY233286, X70185, AB116077, Z35717, V00866, Z72478, S50225; A3 — AB194949, AB194950; dla genotypu B — M54923, D23678, D50522, dla genotypu C — D23680, M38636, D50519, dla podtypu D1 — U9551, X02496, M32138; D2 — Z35716; dla genotypu E — AB091256, AB091255, X75664, X75657; dla geno-

typu F — X69798, X75658, X75663, AB036910, AB036920; dla genotypu G — AB056515, AB056513, AB064311 oraz dla genotypu H — AY090457, AY090454.

W celu uniknięcia zanieczyszczeń amplikonami DNA, na wszystkich etapach związanych z wykrywaniem DNA oraz analizą metodą PCR, stosowano środki zapobiegawcze opisane uprzednio [97].

3.2.2. Charakterystyka molekularna B19V

Badanie DNA B19V prowadzono dwiema alternatywnymi metodami ilościowymi z wykorzystaniem metody *real time* PCR na aparatach ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Singapur, Singapur) lub Corbett 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) [75, 98]. W obu przypadkach wykorzystano sondy hydrolizujące typu TaqMan skierowane do fragmentów genów, odpowiednio VP1 i NS1 [75, 98]. W drugiej metodzie, jako kontrolę wewnętrzną, zastosowano dodatkowe primery oraz sondę do wykrywania w osoczu fragmentu genu kodującego CCR5. Amplifikację prowadzono wykorzystując TaqMan Universal PCR Master mix (Roche Branchbur, New Jersey, Stany Zjednoczone) w objętości 25 μ l, co zawierało 10 μ l ekstraktu kwasów nukleinowych. 100% wykrywalność określono na 5 IU/reakcję oraz 20 IU/reakcję odpowiednio dla badań, w których wykrywano VP1 i NS1. Genotypy 1–3 wykrywane są obiema metodami, wykazano jednak, że metoda specyficzna względem genu VP1, stosowana do końca roku 2006, zaniża ilość jednego z podtypów genotypu 3 [74]. Amplifikację poprzedzano jedną z dwóch metod izolacji kwasów nukleinowych: QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy) lub Nuclisens Extractor (Nuclisens Automated Isolation Reagents, BioMerieux, Boxtel, Holandia). Obie procedury były wykonywane zgodnie z zaleceniami producenta.

Na potrzeby genotypowania analizowano fragment genomu B19V obejmujący region NS1/VP1u, o długości niemal 1 kb. Amplifikowano go metodą *nested* PCR [67], następnie dwie nici poddawano bezpośredniemu sekwencjonowaniu (ABI PRISM 3.1 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Warrington, UK). Dokonano zestawienia otrzymanych sekwencji w programie CLUSTAL W [99], które wykorzystano do stworzenia drzewa filogenetycznego za pomocą programu MEGA 4.0 [100] z zastosowaniem metody odległościowej Jukes-Cantor. Dla oceny istotności analizy filogenetycznej, przeprowadzono analizę typu *bootstrap*, wykonując 1000 powtórzeń metodą przyłączania najbliższego sąsiada (*neighbour-joining*). Stosowano sekwencje referen-

cyjne pochodzące z GenBank: dla genotypu 1. izolat Au (M13178) [101] oraz dwa izolaty z Wietnamu (DQ225149 — podtyp 1a i DQ357064 — podtyp 1b) [68]; dla genotypu 2. izolat A6 (AY044266) [66] oraz LaLi (AY064475) [102]; dla genotypu 3. podtyp 3a wariant V9 (AX003421) [65], zaś podtyp 3b reprezentował virus D91.1 (AY083234) [67].

3.2.3. Badania markerów serologicznych zakażenia HBV oraz B19V

Ocenę ilościową HBsAg wykonano testem Architect HBsAg (Abbott Diagnostics Division, Sligo, Irlandia), HBeAg i przeciwciała skierowane do antygeny e HBV (anty-HBe) wykrywano testem ADALTIS EIAgen HBe Ab/Ag Kit (Adaltis, Bolo- nia, Włochy). Przeciwciała do antygeny powierzchniowego wirusa HBV (anty-HBs) badano testem VIDAS Anti-HBs Total Quick (BioMerieux, Lyon, Francja).

Badanie swoistych przeciwciał anty-B19V wykonano komercyjnym testem recomWell Parvovirus B19 IgG/IgM ELISA (Mikrogen GmbH, Neuried, Niemcy) zgodnie z zaleceniami producenta.

Analizy statystyczne oraz wykresy wykonywano programem Statistica 9.0 (Statsoft, Stany Zjednoczone/Polska).

Badania zostały zatwierdzone przez Komitet Etyczny przy Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

4. Wyniki

4.1. HBV

4.1.1. Wirusologiczna i molekularna charakterystyka dawców zakażonych HBV na wczesnym etapie zakażenia

Przeanalizowano próbki 7 dawców (6 mężczyzn i 1 kobiety) w wieku od 21 do 57 lat (mediana 40 lat) zakażonych na wczesnym etapie zakażenia. W badaniach przeglądowych wykryto u nich DNA HBV, nie stwierdzono natomiast HBsAg. Poziom DNAemii HBV był niski, od ilości poniżej czułości testu ilościowego do 140 IU/ml (mediana 10,12 IU/ml) (tab. 3). W pięciu z sześciu dostępnych próbek, w których wykonywano badania przeglądowe, nie stwierdzano obecności żadnych dodatkowych markerów serologicznych zakażenia HBV; w jednej dodatkowo wykryto przeciwciała anty-HBc klasy IgM, anty-HBs oraz anty-HBe. W przypadku 5 dawców wielokrotnych możliwe było zbadanie wcześniejszych próbek — u żadnego nie wykryto DNA ani żadnego z markerów serologicznych. W trakcie badania kolejnych dostępnych próbek, w przypadku czterech osób wykryto markery zakażenia HBV.

Tabela 3. Charakterystyka wirusologiczna trzech grup dawców zakażonych HBV

Table 3. Viral characteristics of three groups of HBV infected blood donors

	Dawcy zakażenia		
	„w okienku” n = 7	HBsAg dodatni n = 170	z OBI n = 40
Wiek			
Mediana	40	21	47
Zakres	21–57	18–68	23–61
Płeć			
Mężczyźni	6 (85,7%)	143 (84,1%)	35 (94,6%)
Kobiety	1 (14,3%)	27 (15,9%)	2 (5,4%)
ALT			
< 80 IU/L	100%	65 (95,6%)	100%
> 80 IU/L	0%	3 (4,4%)	0%
Anty-HBs²			
Badanych	6	121	37
Dodatnich	1 (16,7%)	6 (5%)	7 (18,9%)
Antygen HBe			
Badanych	6	123	21
Dodatnich	1 (16,7%)	13 (10,5%)	0 (0%)
Anty-HBe			
Badanych	6	118	21
Dodatnich	1 (16,7%)	109 (92,4%)	8 (38,1%)
Poziom DNA HBV (IU/ml)			
Badanych	7	170	40
Mediana	10,12	$4,1 \times 10^3$	17
Zakres	–140	$0-3,1 \times 10^{10}$	-4×10^3
Stężenie HBsAg (IU/ml)			
Badanych		121	
Mediana	Nie wykryto*	1×10^4	Nie wykryto*
Zakres		$1,2 \times 10^{-1}-1,2 \times 10^5$	

*dawcy zakażenia HBV, u których nie wykryto HBsAg byli badani testami przesiewowymi Hepanostica HBsAg Ultra (bioMeriux) oraz testem System 3 (Ortho Clinical Diagnostics) o czułości odpowiednio 0,12 ng/ml oraz 0,10–0,17 ng/ml; wykrywanie mutantów w determinancie a została opisana odpowiednio przez van Rosmalen i wsp. [103] i La’ulu i wsp. [104]

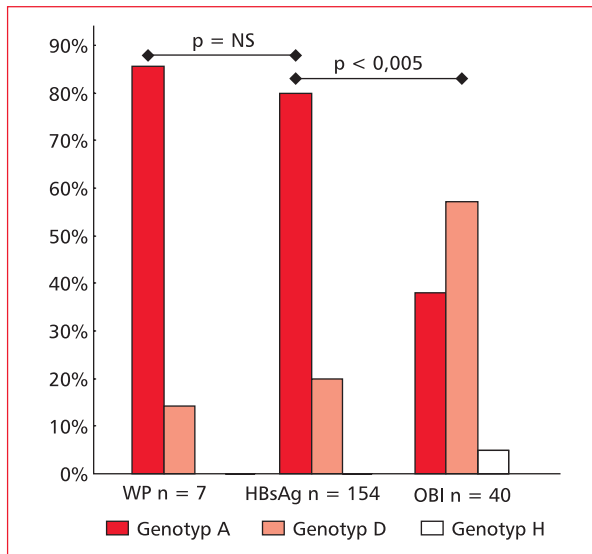
U dwóch, oprócz DNA HBV stwierdzono antygen HBs, u jednej z nich dodatkowo anty-HBc klasy IgM. U kolejnych dwóch osób w próbkce *follow-up* nie wykryto DNA HBV, stwierdzono natomiast pojawienie się przeciwciał anty-HBs; u jednego dawcy dodatkowo wykryto anty-HBc. Przedstawione wyniki badania szerokiego panelu markerów zakażenia HBV wykazały, że dawcy zaklasyfikowani do tej grupy znajdowali się w fazie okienka serologicznego poprzedzającego wykrycie antygenu HBs (*pre-HBsAg WP*) lub na etapie ograniczenia/eliminacji zakażenia we wczesnej fazie zakażenia (*early recovery stage*).

Analizy polimorfizmu w tej grupie dokonano przez sekwencjonowanie regionu S, a następnie przeanalizowano sekwencje za pomocą programu BLAST oraz Genotyping. Za wyjątkiem jednego dawcy zakażonego genotypem D, wszyscy dawcy z tej grupy byli zakażeni genotypem A. (ryc. 1). Jed-

nocześnie stwierdzono, że wszystkie sekwencje aminokwasowe analizowanych izolatów mają charakter dziki, bez substytucji różniących je od sekwencji referencyjnej.

4.1.2. Ogólna charakterystyka wirusologiczna dawców z antygenem HBs

Próbki osocza z HBsAg potwierdzonym w teście neutralizacji/NAT pochodziły od 170 dawców pierwszorazowych z różnych części Polski. Ich wiek wahał się od 18 do 68 lat (mediana 21), stosunek liczby mężczyzn do liczby kobiet wynosił 5:3. Wszystkie próbki były anty-HCV i RNA HCV ujemne oraz anty-HIV i RNA HIV ujemne. U 65/68 dawców, dla których dostępne były wyniki badania aktywności ALT w osoczu, wartość tego parametru była w granicach normy. W osoczu 160 badanych próbek mediana stężenia DNA HBV wynosiła $4,1 \times 10^3$ IU/ml, zakres od $2,0 \times 10^1$ IU/ml do $3,1 \times 10^{10}$

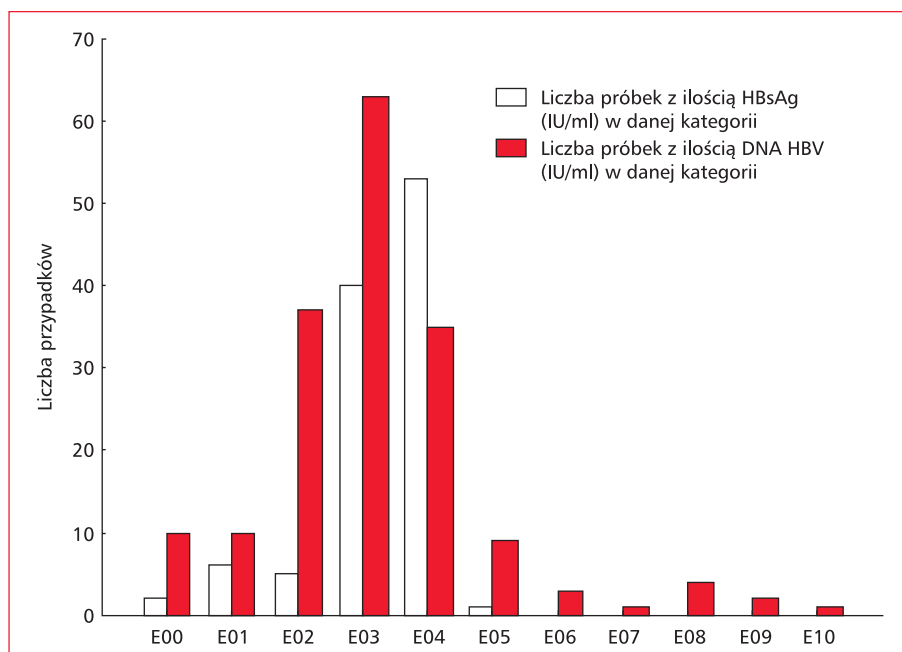


Rycina 1. Genotypy HBV u dawców na różnych etapach zakażenia. Na rycinie zaznaczono istotność statystyczną obserwowanych różnic; istotne różnice w częstości genotypów pomiędzy OBI i dawcami z HBsAg, natomiast brak istotnych różnic pomiędzy WP a pozostałymi grupami (z powodu małej liczebności)

Figure 1. HBV genotype in donors in different phases of infection. The figure presents the statistical significance of differences; significant differences in genotype distribution between OBI and HBsAg carriers, natomiast brak istotnych różnic pomiędzy WP a pozostałymi grupami (z powodu małej liczebności)

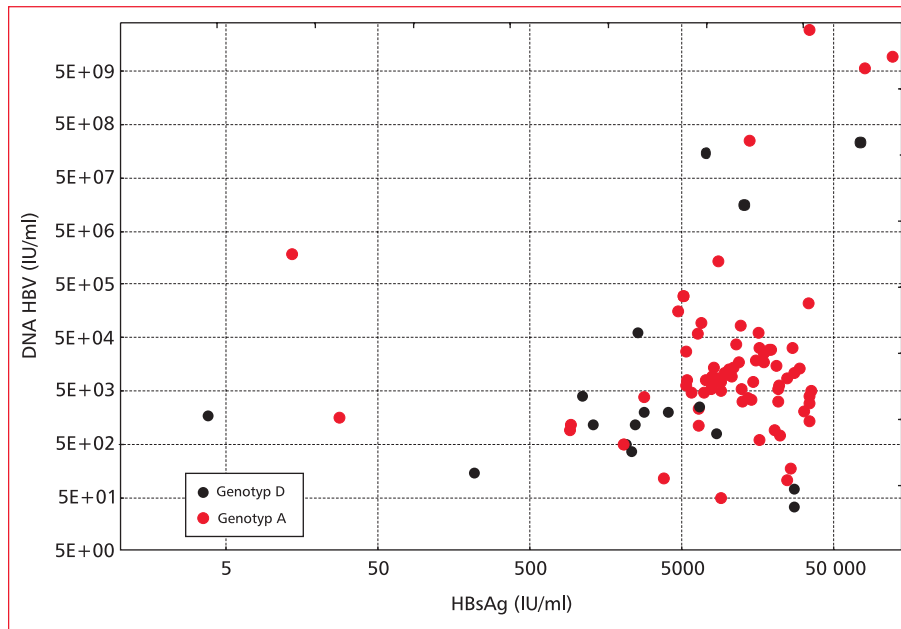
IU/ml. W 10 próbkach uzyskano ujemny wynik badania ilościowego metodą *real-time* PCR. Rozkład stężenia DNA HBV i HBsAg przedstawiono na rycinie 2. W 82% próbek, DNAemia mieściła się w zakresie pomiędzy 10^2 IU/ml a 10^5 IU/ml. W 6% i 12% próbek poziom DNA-emii wynosił odpowiednio $< 10^2$ IU/ml i $> 10^5$ IU DNA HBV /ml. Stężenie antygeny HBs określono w 121 próbkach; mieściło się ono w zakresie od 0,12 IU/ml do $1,2 \times 10^5$ IU/ml (mediana 1×10^4 IU/ml). Dla 87% próbek poziom HBsAg był w granicach 10^3 IU/ml a 10^4 IU/ml. Stężenie HBsAg w 12,1% i 0,9% próbek wynosiło odpowiednio $< 10^3$ IU/ml i $> 10^4$ IU/ml.

Oznaczenie ilościowe HBsAg i DNA HBV wykonano w 101 próbkach. Nie zaobserwowano istotnej korelacji pomiędzy tymi parametrami ($r = 0,11$) (ryc. 3). Podobnie, wartość współczynnika nie była istotna, gdy analizę przeprowadzono oddzielnie dla genotypu A2 i D (odpowiednio $r = 0,16$ oraz $r = 0,56$). W celu wyrażenia związku pomiędzy stężeniem HBsAg i DNA HBV, wyliczono wartości współczynnika ilości HBsAg/DNA HBV (oba parametry w IU/ml). Zakres wartości logarytmu naturalnego współczynnika był bardzo szeroki; wahał się od $-12,8$ do $12,3$, mediana 0,8. Wartość współczynnika wyrażona jako logarytm wartości HBsAg/ DNA HBV w osoczu większości próbek (75,2%) mieściła się w zakresie między -2 i 3 . Dla 12,9% i 11,9% próbek $\ln(\text{HBsAg}/\text{DNA HBV})$ wynosił odpowiednio



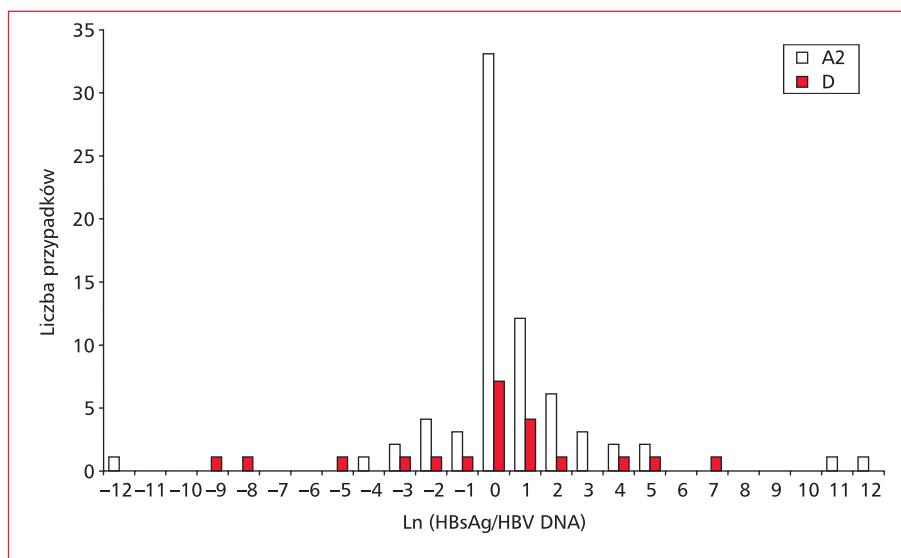
Rycina 2. Analiza ilości DNA HBV oraz HBsAg u dawców z HBsAg. Wyznaczono 11 przedziałów ilościowych wyrażających rząd wielkości stężenia materiału genetycznego lub antygeny

Figure 2. Analysis of HBsAg and HBV DNA quantity in HBsAg positive donors. Eleven ranges of HBsAg and HBV DNA were determined to express quantity of HBV genomes and surface antigen



Rycina 3. Korelacja HBsAg/DNA HBV u dawców zakażonych genotypem A2 (n = 72, czerwone punkty) oraz genotypem D (n = 21, czarne punkty)

Figure 3. Correlation of HBsAg/HBV DNA in genotype A2 (n = 72, red dots) and genotype D (n = 21, black dots)



Rycina 4. Rozkład logarytmu naturalnego współczynnika ilości HBsAg do DNA HBV u dawców zakażonych genotypem A2 (n = 72, słupki pokolorowane) lub D (n = 21, słupki czarne)

Figure 4. Distribution of the natural logarithm of HBsAg/HBV DNA in carriers of genotype A2 (n = 72, open bars) or D (n = 21, closed bars)

< -2 i > 3 . Aczkolwiek w obu przypadkach rozkład wartości współczynnika zasadniczo miał charakter normalny, to był on jednak odmienny dla różnych genotypów (ryc. 4).

Antygen HBe i przeciwciała anti-HBe były badane odpowiednio w 123 i 118 próbkach. Antygen HBe wykryto w 13 próbkach (10,5%), zaś przeciwciała anti-HBe w 109 (92,4%). Obydwa markery były

obecne w 3 próbkach, zaś w 5 nie stwierdzono żadnego z nich. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach dawców [94], poziom DNA HBV był istotnie wyższy ($p < 0,001$) w próbkach HBeAg-dodatnich (mediana $1,8 \times 10^6$ IU/ml, zakres $6,4 \times 10^3$ – $9,7 \times 10^9$ IU/ml) niż w HBeAg-ujemnych (mediana $3,5 \times 10^3$ IU/ml, stężenie od poziomu poniżej progu czułości testu do $1,5 \times 10^8$ IU/ml). Podobnej zależności nie obserwowano jednak podczas analizy poziomu HBsAg (mediana $1,3 \times 10^4$ IU/ml i $1,6 \times 10^4$ IU/ml odpowiednio w próbkach HBeAg-dodatnich i HBeAg-ujemnych). W konsekwencji, wartość współczynnika stężenia HBsAg/DNA HBV była statystycznie znacząco niższa w pierwszej grupie niż w drugiej (mediana 0,0008 *v.* 1,44, $p < 0,001$).

Spśród 121 próbek, w których badano anty-HBs, 6 było reaktywnych (5%) z niskim stężeniem przeciwciał (mediana $1,45 \times 10^1$ IU/L, zakres od 5 do $3,15 \times 10^2$ IU/L). We wszystkich próbkach, w których wykryto przeciwciała anty-HBs, nie wykrywano antygeny HBe, natomiast były w nich obecne swoiste przeciwciała anty-HBe. We wszystkich próbkach z przeciwciałami anty-HBs zarówno stężenie DNA HBV, jak i HBsAg było relatywnie niskie. Mediana poziomu DNA HBV wynosiła $1,0 \times 10^3$ IU/ml, wahając się od wartości poniżej czułości analitycznej testu ilościowego do $1,1 \times 10^5$ IU/ml. Mediana stężenia antygeny HBs wynosiła $0,7 \times 10^1$ IU/ml, wahając się od 0,4 do $2,7 \times 10^4$ IU/ml.

Spśród 36 dawców, dla których dostępne były informacje dotyczące immunizacji przeciw HBV, ośmiu było szczepionych (22,2%). Sześciu immunizowanych anty-HBsAg dodatnich dawców badano na obecność przeciwciał anty-HBs i we wszystkich badanych próbkach uzyskano wynik ujemny.

4.1.3. Szczegółowa charakterystyka genu HBV od dawców z antygenem HBs

Polimorfizm genetyczny HBV oceniano na podstawie analizy sekwencji całego genomu losowo wybranych próbek ($n = 53$) lub na podstawie sekwencji regionu pre-S/S lub/i BCP/PC (odpowiednio 91 i 154 sekwencji).

Analiza filogenetyczna sekwencji całych genomów wykazała, że 45 z nich znalazło się w jednej grupie z sekwencjami podtypu A2, dwa z podtypem D1 i sześć z podtypem D2. Wartość *bootstrap* wynosiła odpowiednio 100%, 92% i 99% przy wykonywaniu 1000 powtórzeń (ryc. 5). Analiza filogenetyczna sekwencji BCP/PC (dane nieprzedstawione) była mniej informatywna, ale pozwoliła na identyfikację genotypów A i D w kolejnych 101 izolatach, dla których nie dysponowano sekwencjami całych genomów. Genotyp A zidentyfikowano

w 79, zaś genotyp D w 22 próbkach. Zgromadzone dane pozwoliły na określenie genotypu w 154 próbkach, w których wykryto antygen HBs; 124 zaklasyfikowano do genotypu A (80,5%), 30 do genotypu D (19,5%).

Dalsze porównania molekularne i wirusologiczne prowadzono w dwóch grupach dawców zakażonych genotypem A(2) i D. Ogólną charakterystykę genotypu A(2) i D przedstawiono w tabeli 4.

4.1.3.1. Region Pre-S/S

Sekwencje aminokwasowe regionu pre-S/S uzyskano dla 17 izolatów genotypu D i 74 genotypu A. W stosunkowo dużej liczbie sekwencji regionu pre-S/S zidentyfikowano obecność delekcji (6 sekwencji), mutacji w kodonie startowym (3 sekwencji) lub w kodonie stop genu S (7 sekwencji). Tego typu mutacje występowały równie często w izolatach genotypu A2, co genotypu D. Mutacje prowadzące do powstania kodonu stop w genie S, kończyły przedwcześnie syntezę białka na końcu C, w pozycji aminokwasowej 201, 206 lub 216, jednak funkcjonalnie nie były istotne. We wszystkich trzech próbkach, w których identyfikowano mutacje kodonu start, stwierdzano poziom wirerii $> 1 \times 10^4$ IU/ml, co sugeruje mniejszościową obecność form dzikich. Inne krótkie delekcje często spotykane w regionach pre-S1 czy pre-S2 nie miały znaczenia funkcjonalnego. Na uwagę zasługują dwie sekwencje genotypu A2 (P153 i P193), w których stwierdzono rozległą delekcję w pre-S1/pre-S2 obejmującą 104 i 94 aminokwasy, co jednak nie wpływało na ekspresję genu S. Delekcje te zidentyfikowano w trakcie badania całego genomu lub podczas amplifikowania jedynie regionu pre-S/S.

Na poziomie sekwencji aminokwasowej w regionie pre-S/S wyższą zmienność obserwowano dla genotypu D niż podtypu A2. Mediana poziomu zmienności wynosiła 16% dla sekwencji genotypu D (zakres 2–34%) i 6% dla genotypu A (zakres 0–22%). W regionie MHR genu S, większość izolatów miała charakter dzikich podtypu A2 lub genotypu D, jednak w 16 sekwencjach stwierdzono substytucje aminokwasowe (16/91 — 17,6%). Obserwowano istotne różnice między genotypem A2 i D w częstości szczepów z substytucjami. Dziesięć z 17 (58,8%) izolatów genotypu D różniło się od sekwencji konsensusowej o przynajmniej jedną substytucję (w izolacie P122 stwierdzono 7 substytucji, w P89 dwie) i tylko 6 z 74 izolatów genotypu A2 (8,1%), w 2 stwierdzono substytucje podwójne (ryc. 6). Substytucje miały charakter specyficzny dla danego genotypu, za wyjątkiem substytucji T125M i T126I wykrytych w pojedynczych izolatach każdego genotypu (tab. 5). Uwagę zwracają substytu-

Rycina 5. Analiza filogenetyczna wg algorytmu *neighbour-joining* sekwencji pełnych genomów pochodzących od 53 dawców krwi z HBsAg oraz sekwencji referencyjnych pochodzących z GenBank. Zaznaczono wartości *bootstrap* otrzymane w trakcie 1000 powtórzeń jak również numery zgłoszeniowe i genotypy oraz podtypy sekwencji pochodzących z GenBank. Sekwencje oznaczone kolorem pochodzą z obecnych badań: sekwencje podtypu A2 zaznaczono na czerwono, zaś sekwencje genotypu D, na różowo

Figure 5. Neighbour-joining phylogenetic tree of full genome sequences from 53 Polish blood donors carrying HBsAg and GenBank references. Bootstrap support values obtained from 1000 replicates are indicated as well as accession number and genotype/subgenotype of sequences obtained from GenBank are indicated. Sequences in colour are from this study: sequences of subgenotype A2 are in red and those of genotype D in pink



Tabela 4. Charakterystyka 170 HBsAg-dodatnich polskich pierwszorazowych dawców krwi**Table 4.** Characteristics of 170 HBsAg-positive Polish first time donors

	Liczba (%)		Dawcy zakażenia	
	Łącznie		Genotypem A2	Genotypem D
	170		124 (80,5%)	30 (19,5%)
Wiek				
Mediana	21	21	23	
Zakres	18–68			
Płeć				
Mężczyźni	143 (84,1%) ¹	98 (84,5%)	24 (82,7%)	
Kobiety	27 (15,9%)	18 (15,5%)	5 (17,3%)	
ALT				
< 80 IU/L	65 (95,6%)	51	14	
> 80 IU/L	3 (4,4%)	2	1	
Anty-HBs²				
Badanych	121	84	22	
Dodatnich	6 (5%)	2 (2,4%)	2 (9,1%)	
Antigen HBe				
Badanych	123	86	21	
Dodatnich	13 (10,5%)	10 (11,6%)	3 (14,3%)	
Anty-HBe				
Badanych	118	86	21	
Dodatnich	109 (92,4%)	76 (88,4%)	18 (86%)	
Poziom DNA HBV (IU/ml)				
Badanych	170	124	30	
Mediana	$4,1 \times 10^3$	$7,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	
Zakres	$0-3,1 \times 10^{10}$	$0-3,1 \times 10^{10}$	$3,3-2,4 \times 10^8$	
Stężenie HBsAg (IU/ml)				
Badanych	121			
Mediana	1×10^4	$1,2 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$	
Zakres	$1,2 \times 10^{-1}-1,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-1}-1,2 \times 10^5$	$3,78-7,4 \times 10^4$	

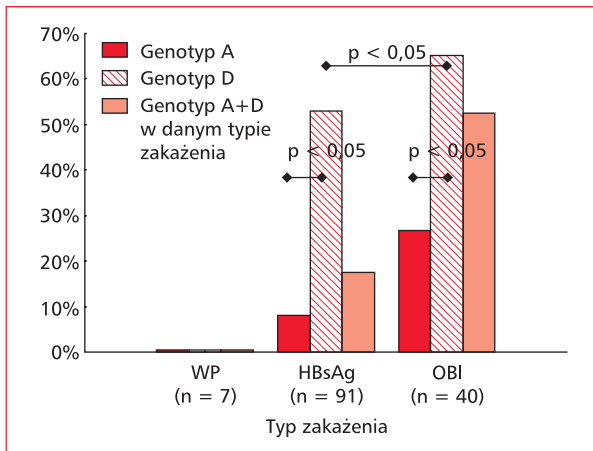
1. Suma próbek genotypu A2 i D jest niższa niż całkowita liczba wszystkich próbek, ponieważ niektóre próbki nie zostały zgenotypowane ze względu na brak amplifikacji informatywnego regionu genu HBV, inne zaś nie zostały zgenotypowane ze względu na brak odpowiedniej ilości materiału

2. Mediana stężenia: 14,5 IU/l; zakres 5–315 IU/l

cje, o których wiadomo, że w sposób istotny upośledzają rozpoznanie HBsAg przez przeciwciała: M133T obecne w jednym izolacie, P120A/T w dwóch i D144G w jednym izolacie; wszystkie sekwencje sklasyfikowano jako genotyp D [24, 105]. W izolacie P122 genotypu D zidentyfikowano jednocześnie mutacje prowadzące do dwóch pierwszych substytucji. W tej próbce stwierdzono ledwo wykrywalne stężenie antygenu HBs (0,12 IU/ml) i DNA HBV (< 5 IU/ml). Na podstawie sekwencji DNA przewidziano serotypy HBsAg [25]. Wszystkie szczepy A2 zostały sklasyfikowane jako serotyp adw (n = 125), zaś szczepy genotypu D zaliczono do serotypu ayw (n = 29).

4.1.3.2. BCP/PC

Dziki typ promotora rdzeniowego (BCP) obserwowano w 55 ze 154 analizowanych sekwencji (35,7%); częściej w przypadku genotypu A niż genotypu D (38,4% v. 10,3%; p < 0,05). W tym regionie przeanalizowano mutacje opisane wcześniej jako związane z niską wiremią oraz rozpoczęciem produkcji anty-HBe (tab. 6). Podwójne mutacje w pozycji 1762T i 1764A zidentyfikowano w 55/154 sekwencji (35,7%). Mutacje 1762T i 1764A występowały jednocześnie (n = 55) za wyjątkiem jednej sekwencji, gdzie stwierdzono pojedynczą mutację 1762T oraz 11 sekwencji z pojedynczą mutacją



Rycina 6. Porównanie częstość izolatów z substytucjami aminokwasowymi w regionie MHR genu S u dawców z różnymi typami zakażenia HBV oraz w zależności od genotypu wirusa. Średnia częstość izolatów z substytucjami wśród dawców zakażonych OBI była większa niż u dawców z HBsAg; zarówno u dawców z HBsAg, jak i z OBI częstość substytucji była większa w przypadku genotypu D niż A. W izolatach dawców na wczesnym etapie zakażenia (WP) nie zidentyfikowano żadnych substytucji. Porównanie tej grupy z pozostałymi nie było miarodajne ze względu na małą liczebność

Figure 6. Comparison of the frequency of strains with amino acid substitution in MHR region of gene S in blood donors in different phases of HBV infection and dependent on viral genotype. Average frequency of isolates with substitutions in OBI donors was higher than in donors with HBsAg. In both groups the substitutions were observed more frequently in genotype D than A. In donors in early stage of HBV infection no substitutions were identified. In this case the comparison with isolates from other forms of HBV infection was inconclusive due to limited number of cases

1764A. Obserwowano tendencję częstszego występowania podwójnych mutacji w pozycji 1762 i 1764 w izolatach genotypu A niż genotypu D (odpowied-

nio 39,2% i 20,7%; $p = 0,08$). Dodatkowo analizowano inne mutacje zlokalizowane w obrębie promotora rdzeniowego (*core promoter mutations*) opisane ostatnio jako czynnik wpływający na replikację wirusa [43]. Substytucje T1753C, C1766T i T1768A stwierdzono odpowiednio w 19 (15,2%), 33 (26,4%) i 7 (5,6%) izolatach genotypu A. Wielokrotne mutacje 1766T/1768A, 1762T/1764A/1766T i 1753C/1762T/1764A występowały wyłącznie w zakażeniach genotypem A — obserwowano je w odpowiednio 7 (5,6%), 24 (19,2%) i 9 (7,2%) sekwencjach.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic stężenia DNA HBV i HBsAg w próbkach, w których zidentyfikowano wymienione mutacje (pojedynczo lub kilka jednocześnie) w porównaniu z izolatami dzikimi BCP. W 4 izolatach genotypu A (3,2%) obserwowano delecje w BCP: w próbce P100 obejmowała sekwencje od pozycji nukleotydowej 1763 do 1771; w próbce P36, P135 i P189 delecje obejmowały pozycje nukleotydowe od 1763 do 1770. Poziom HBV DNA był w nich wysoki ($1,6 \times 10^5$; $7,5 \times 10^5$; $2,4 \times 10^5$ i $1,3 \times 10^5$ IU/ml), dwie z omawianych próbek były HBeAg dodatnie.

Mutacja w kodonie stop, pozycja nt. 1896, została stwierdzona w 30 izolatach (19,5%), w tym 10/125 genotypu A2 (8%) i 20 sekwencjach (69%) genotypu D ($p < 0,05$). Mutacja w kodonie startowym syntezy białka *precore* została zidentyfikowana w 17 (11%) spośród wszystkich analizowanych sekwencji obu genotypów. W 27 spośród 154 analizowanych sekwencji (17,5%) stwierdzono insercje lub delecje nukleotydowe w pre-C, które powodowały przesunięcie ramki odczytu (*frame-shift*). Wszystkie przypadki tego typu mutacji, za wyjątkiem jednej, dotyczyły genotypu A (20,8%). Zazwyczaj obserwowano delecje lub insercje pojedynczych nukleotydów; insercje dwu- i siedmionukleotydowe stwierdzono tylko w 2 sekwencjach.

4.1.3.3. Polimeraza i gen X

W domenie odwrotnej transkryptazy polimerazy nie obserwowano występowania substytucji

Tabela 5. Substytucje w regionie MHR genu S HBV od dawców z HBsAg i z OBI w sekwencjach różnych genotypów

Table 5. Substitutions in MHR region of S gene in donors with HBsAg and with OBI and in different genotypes

Genotyp	Substytucje aminokwasowe w izolatach HBV zidentyfikowanych u dawców	
	HBsAg dodatnich	z OBI
A	T116N, T125M, T126I, G130N (2), N131S, S155Y	C124Y, T125M, T126N, Q129R, M132I, G145A
D	Y100S, M103I, T108A (4), P120A, P120T, T125M, T126I, Q129H, Q129R, M133T, M133I, M134S, M134S, T140I, D144G	T115N, T116S(2), T118A (3), T118R, P120L, P120S, P120Q (3), P120T, T123A, T126I (2), T126N, A128V (3), M133T, M133I, Y 134N, S136Y, C139S, S143L (2), D144A (2), D144G, G145A
H	Brak zakażeń	T126N, A128V, D144E (2), S143L

Tabela 6. Częstość wybranych mutacji w regionie BCP/PC izolatów genotypu A i D zidentyfikowanych u dawców z antygenem HBs**Table 6.** Frequency of selected mutations in the BCP/PC region in genotype A and genotype D strains identified in blood donors with HBsAg

Genotyp (Liczba analizowanych sekwencji)	Mutacje w BCP						Mutacje w PC	
	Liczba (%) izolatów z mutacjami						Liczba (%) izolatów z mutacjami	
	T1753C	A1762T	G1764A	C1766T	T1768A	G1896A	preC ATG	Insercje/ /delekcje*
D (n = 29)	5 (17,2)	6 (20,7)	8 (27,6)	1 (3,5)	1 (3,5)	20 (69)	3 (10,3)	1 (3,5)
A (n = 125)	19 (15,2)	50 (40)	58 (46,4)	33 (26,4)	7 (5,6)	10 (8)	14 (11,2)	26 (20,8)
P	NS	0,056	0,095	0,005	NS	< 0,01	NS	0,029

*przesunięcie ramki odczytu (*frame shift*)

aminokwasowych w pozycjach 80, 180, 204, 236, które wcześniej opisano jako związane z występowaniem oporności na leki przeciwwirusowe [46].

W 39/52 analizowanych sekwencji genu X zidentyfikowano mutacje prowadzące do substytucji aminokwasowych; w jednej sekwencji (P23) występowała mutacja w ATG (GTG). Mutacje w tym genie były częstsze u dawców zakażonych genotypem A2 niż D (odpowiednio 37/44 (84,1%) i 5/8 (62,5%)). Pozycje substytucji były specyficzne dla poszczególnych genotypów. W przypadku genotypu D zidentyfikowano substytucje T47S, K130M i V131I w odpowiednio 3 (37,5%), 2 (25%) i 3 (38%) sekwencjach. W sekwencjach genotypu A2 najczęściej identyfikowano substytucje M130K i V131I; odpowiednio 21 (47,7%) i 18 razy (40,9%).

4.1.4. Wirusologiczna i molekularna charakterystyka dawców z ukrytym zakażeniem HBV

Charakterystykę wirusologiczną dawców z OBI w porównaniu z dawcami zakażonymi na wczesnym etapie zakażenia oraz dawców–nosicieli antygeny HBs przedstawiono w tabeli 3. W grupie z OBI analizowano 40 dawców, w większości mężczyzn (35/37, 94,6%), którzy byli starsi od dawców z HBsAg (mediana 47 lat, 23–61 lat). Do tej grupy zaklasyfikowano dawców, w osoczu których podczas badań przeglądowych wykryto DNA HBV, jednocześnie nie stwierdzając obecności HBsAg. Dodatkowo stwierdzano u nich markery serologiczne zakażenia HBV — u wszystkich wykrywano przeciwciała anti-HBc, u 7/37 badanych wykryto przeciwciała anti-HBs (18,9%). U 8/ 21 (38,1%) stwierdzono przeciwciała anti-HBe, ale u żadnego z nich w osoczu nie było wykrywalnego antygeny HBe. Poziom DNA HBV wahał się od ilości poniżej czułości testu

ilościowego do 4×10^3 IU/ml (mediana 17 IU/ml). W próbkach pobranych od dawców z przeciwciałami anti-HBs stwierdzano od 1 do 21 IU DNA HBV/ml (mediana 5,5 IU DNA HBV/ml).

Na podstawie analizy sekwencji pre-S/S określono genotypy HBV. Częstość wykrywania genotypu A i D różniła się od obserwowanej u dawców z HBsAg. Częściej identyfikowano w tej grupie zakażonych genotypem D, rzadziej zaś genotypem A (ryc. 1). Dodatkowo stwierdzono zakażenie dotychczas niewykrywanym u dawców genotypem H. Dawcy zakażeni tą odmianą polimorficzną pochodzili z Wałbrzycha i Bydgoszczy (w obydwu przypadkach mężczyźni w wieku 53 lat). Oprócz bardzo niskiego stężenia DNA HBV (ilość poniżej czułości testu ilościowego), u obu wykryto anti-HBc, a u jednego również przeciwciała anti-HBe.

Wstępna analiza programem Genotyping oraz BLAST wykazała największe podobieństwo (98–99%) sekwencji wstępnie zaklasyfikowanych jako genotyp H do sekwencji pochodzących z Meksyku [106]. Prezentowana wstępna klasyfikacja przynależności izolatu HBV od tych dawców do genotypu H została oparta na analizie ~10% genomu HBV i wymaga dalszego potwierdzenia przez sekwencjonowanie całego genomu.

Szczegółowa analiza porównawcza regionu MHR w trzech analizowanych grupach zakażonych dawców wykazała występowanie najwyższej częstości substytucji (52,5%) u dawców z OBI (ryc. 6). Mutacje prowadzące do zmian aminokwasów w sekwencji białka powierzchniowego występowały u ponad połowy dawców zakażonych genotypem D (65,2%) i ponad dwukrotnie rzadziej ($p < 0,05$) u dawców zakażonych genotypem A (26,7%). U dawców z OBI zakażonych genotypem A obserwowano po dwa izolaty z mutacjami prowadzącymi do poje-

dynczych i podwójnych substytucji. W przypadku genotypu D, w 8 sekwencjach zidentyfikowano pojedyncze substytucje, a w kolejnych 7 wielokrotnie (jedna z 2, cztery z 3 oraz po jednym izolacie z 4 i 5 substytucjami). W genotypie H oba izolaty były nosicielami wielokrotnych mutacji (2 i 3). W porównaniu z próbkami HBsAg-dodatnimi, w przypadku OBI, w ogólnej liczbie sekwencji z mutacjami prowadzącymi do substytucji aminokwasowych obserwowano tendencję do większego udziału substytucji wielokrotnych (4/16 — 25% vs. 11/21 — 52,4% $p = 0,09$). Substytucje wykryte w regionie MHR sekwencji genu S od dawców z OBI przedstawiono w tabeli 5.

4.1.5. Dystrybucja geograficzna genotypów HBV

HBsAg

Z poszczególnych RCKiK przekazano na badania polimorfizmów od 2 do 20 próbek. Dystrybucję geograficzną genotypów HBV analizowano, porównując część północną (Szczecin, Słupsk, Gdańsk, Zielona Góra, Olsztyn, Bydgoszcz, Poznań) i południową (Łódź, Wrocław, Wałbrzych, Opole, Katowice, Racibórz, Kraków, Rzeszów, Kielce, Radom) oraz wschodnią (Olsztyn, Kraków, Rzeszów, Kielce, Radom, Łódź) i zachodnią Polski (Szczecin, Słupsk, Gdańsk, Zielona Góra, Poznań, Bydgoszcz, Wrocław, Wałbrzych, Opole, Katowice i Racibórz).

Genotyp A był wykrywany w 82,4% próbek pochodzących z północnej oraz w 74,5% dawców z Polski południowej; genotyp D odpowiednio w pozostałych 17,6% oraz 25,5% badanych próbek. Obserwowane różnice nie były statystycznie istotne ($p = 0,1525$). W analizie porównawczej wschodniej i zachodniej Polski, stwierdzono, że w części położonej bliżej granicy z Niemcami genotyp A zidentyfikowano częściej niż w rejonach położonych bliżej granicy z Białorusią i Ukrainą (83% v. 69,3%). Z kolei genotyp D wykrywano prawie dwukrotnie częściej we wschodniej części kraju niż w zachodniej (30,7% v. 16,1%, $p = 0,021$).

WP i OBI

Ze względu na ograniczoną liczbę izolatów WP i OBI oraz brak pełnej informacji, w przypadku tych grup nie analizowano dystrybucji geograficznej form polimorficznych.

Dawcy we wczesnym etapie zakażenia pochodzili z Wałbrzycha, Opola, Łodzi, Rzeszowa ($n = 2$) oraz Katowic ($n = 2$, jeden zakażony był genotypem D).

Dawcy, u których badano polimorfizm ukrytego zakażenia HBV pochodzili m.in. z Katowic ($n = 4$), Krakowa, Warszawy ($n = 3$), Raciborza ($n = 2$),

Poznania ($n = 2$), Opola, Wałbrzycha ($n = 2$), Wrocławia ($n = 2$), Kalisza i Bydgoszczy.

4.2. Parvovirus B19 (B19V)

4.2.1. Ogólna charakterystyka kliniczna i wirusologiczna chorych zakażonych B19V

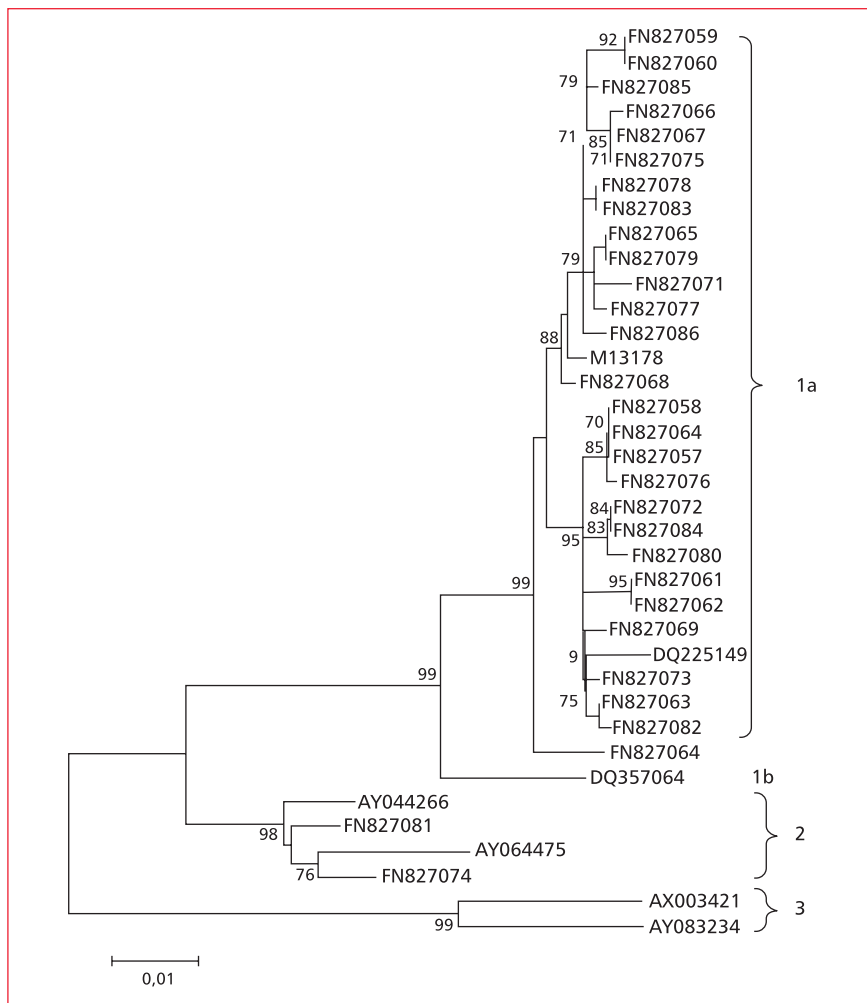
W tabeli 7 przedstawiono charakterystykę kliniczną oraz wirusologiczną pacjentów zakażonych B19V analizowanych w niniejszej pracy. Większość z nich (za wyjątkiem P1–3, P9, P11, P16, P17, P19, P21, P24 i P25) miała osłabioną odporność ze względu na chorobę podstawową, leczenie immunosupresyjne lub chemioterapię. Badane próbki pochodziły od osób z objawami zakażenia B19V, na ogół w trakcie ostrej fazy infekcji. Na wczesny/ostry etap zakażenia wskazywała obecność przeciwciał klasy IgM (P1, P3, P7, P9–11, P13, P18, P19, P21, P22, P24–27, P29, P30) lub poziom DNA B19V powyżej 10^4 IU/ml (P2, P5, P8, P12, P14–17, P20, P28). Spośród 28 pacjentów, dla których dostępne były wyniki badań serologicznych, u 16 wykryto swoiste przeciwciała klasy IgM i IgG, u jednej tylko IgM; przeciwciał nie stwierdzono we krwi 7 chorych z osłabioną odpornością (tab. 7). U dalszych 3 pacjentów stwierdzono obecność specyficznych przeciwciał klasy IgG. Koncentracja DNA B19V wahała się od 10^2 do 10^{11} IU/ml. U 17 pacjentów markery zakażenia B19V były monitorowane przez okres od 2 do 255 tygodni. U wszystkich pacjentów, dla których dostępne były dane dla okresu dłuższego niż 1 miesiąc, poziom B19V DNA zmniejszał się, aczkolwiek nie obserwowano całkowitego zaniku kwasów nukleinowych wirusa w osoczu. Najdłuższy okres obserwacji zakażenia u osoby z prawidłową oraz osłabioną odpornością wynosił odpowiednio 124 i 255 tygodni. W przypadku jednego pacjenta leczonego immunosupresyjnie (P7), którego zakażenie monitorowano przez 114 tygodni, pomimo stosowania wysokich dawek immunoglobulin podawanych dożylnie, obserwowano utrzymywanie się wysokiego poziomu B19V z towarzyszącą przewlekłą anemią, przejściowo ulegającą zaostrzeniu.

4.2.2. Analiza sekwencji B19V

Większość analizowanych sekwencji B19V należała do genotypu 1, jednak spośród 30 izolatów, dwa (6,7%) zidentyfikowano jako genotyp 2. Oba zostały wykryte u 2 spośród 19 pacjentów z osłabioną odpornością (10,5%). Polimorfizm analizowanego regionu genomu obejmującego geny NS1 i VP wahał się od 0 do 2% dla genotypu 1 i wynosił 2% dla genotypu 2. Różnice pomiędzy genotypem 1 a genotypem 2, wynosiły od 7% do 8%. Izolaty P29 i P30 na poziomie sekwencji nukleotydowej wykazywały 98% podobień-

Tabela 7. Kliniczna i wirusologiczna charakterystyka próbek DNA B19V dodatnich**Table 7.** Clinical and virological characteristics of B19V DNA positive samples

Pacjent	Numery zgłoszeniowe sekwencji	Objawy kliniczne	Anty-B19V B19V DNA (IU/ml)		Poziom	Rok/region
			IgM	IgG		
P1	FN827059	Nieimmunologiczny obrzęk płodu, 21. tydzień ciąży	+	+	$8,6 \times 10^6$	2007, Mazowieckie
P2	FN827060	Płód z nieimmunologicznym obrzękiem (matka P1)	-	-	$3,9 \times 10^8$	2007, Mazowieckie
P3	FN827078	Kobieta z nieimmunologicznym obrzękiem płodu	+	+	$6,4 \times 10^6$	2005, Mazowieckie
P4	FN827085	Aplazja	Brak danych	Brak danych	1×10^5	2006, Mazowieckie
P5	FN827083	Pacjent z pancytopenią w trakcie ostrej białaczki limfoblastycznej	-	-	$1,3 \times 10^7$	2005, Mazowieckie
P6	FN827066	Wysypka	-	-	1×10^3	2007, Mazowieckie
P7	FN827067	Splenomegalia i nagły spadek liczby retikulocytów u pacjenta z autoimmunologiczną anemią hemolityczną	+	-	$9,6 \times 10^9$	2007, Mazowieckie
P8	FN827075	Wysypka, gorączka, powiększenie wątroby i śledziony, neutropenia	-	-	2×10^6	2007, Mazowieckie
P9	FN827086	Kryza aplastyczna	+	+	$1,8 \times 10^8$	2006, Mazowieckie
P10	FN827077	Aplazja układu czerwonych krwinek	+	+	$1,1 \times 10^7$	2005, Lubelskie
P11	FN827071	Poronienie	+	+	$4,7 \times 10^2$	2007, Mazowieckie
P12	FN827065	Gorączka, wysypka u pacjenta z ostrą białaczką limfoblastyczną	-	+	$6,9 \times 10^{10}$	2007, Mazowieckie
P13	FN827079	Anemia i splenomegalia	+	+	$1,8 \times 10^4$	2007, Mazowieckie
P14	FN827068	Ciężka anemia po przeszczepieniu hematopoetycznych komórek szpiku	-	-	10^{11}	2007, Pomorskie
P15	FN827082	Przed allogenicznym przeszczepieniem hematopoetycznych komórek szpiku	-	-	$2,8 \times 10^6$	2008, Mazowieckie
P16	FN827057	Kobieta z nieimmunologicznym obrzękiem płodu	-	+	$3,1 \times 10^6$	2007, Mazowieckie
P17	FN827058	Płód z nieimmunologicznym obrzękiem (matka P16)	-	+	4×10^8	2007, Mazowieckie
P18	FN827064	Anemia	+	+	$1,9 \times 10^3$	2007, Mazowieckie
P19	FN827076	Kobieta w ciąży z nieimmunologicznym obrzękiem płodu, 22. tydzień ciąży	+	+	$2,6 \times 10^4$	2007, Mazowieckie
P20	FN827061	Anemia po allogenicznym przeszczepieniu hematopoetycznych komórek szpiku kostnego	-	-	$2,9 \times 10^8$	2004, Mazowieckie
P21	FN827062	Dawczyni szpiku dla P20	+	+	2×10^4	2004, Mazowieckie
P22	FN827072	Aplazja u pacjenta z białaczką limfoblastyczną	+	+	$5,7 \times 10^7$	2006, Śląskie
P23	FN827084	Brak danych	-	-	$8,8 \times 10^2$	2006, Śląskie
P24	FN827080	Poronienie w 13. tygodniu ciąży	+	+	$5,1 \times 10^4$	2006, Mazowieckie
P25	FN827063	Wysypka, gwałtowny spadek liczby retikulocytów u pacjenta z syndromem Evansa	+	+	$2,7 \times 10^6$	2008, Mazowieckie
P26	FN827069	Aplazja	+	+	$1,3 \times 10^4$	2005, Mazowieckie
P27	FN827073	Aplazja	+	+	$9,5 \times 10^3$	2005, Śląskie
P28	FN827070	Aplazja u pacjenta z anemią autoimmunohemolityczną	Brak danych	Brak danych	$1,4 \times 10^6$	2006, Śląskie
P29	FN827081	Anemia po przeszczepieniu nerki	+	+	$6,5 \times 10^9$	2004, Wielkopolskie
P30	FN827074	Anemia u pacjenta z białaczką T-limfoblastyczną	+	+	$4,6 \times 10^9$	2008, Mazowieckie



Rycina 7. Analiza filogenetyczna izolatów B19V wykrytych u polskich pacjentów. Analizie poddano sekwencje o długości 704 bp obejmujące region NS1/VP1 genomu B19V. Na rycinie zaznaczono wartości *bootstrap* > 70. Nazwy sekwencji omawianych w obecnym opracowaniu zaczynają się od FN

Figure 7. Phylogenetic analysis of the B19V strains identified in the Polish patients. The analysis is based upon a 704 bp sequence in the NS1/VP1 region of the B19V genome. Bootstrap values > 70 are shown. Names of sequences from this study begin with FN

stwa względem sekwencji referencyjnych dla genotypu 2 (izolaty A6 i LaLi). Analiza filogenetyczna potwierdziła tworzenie jednej grupy przez P29 i P30 z sekwencjami referencyjnymi dla genotypu 2 (ryc. 7), natomiast dalszych 27 izolatów grupowało się z sekwencją referencyjną dla podtypu 1a, jeden izolat (P28) znalazł się pomiędzy podtypem 1a oraz 1b. Omawiane w niniejszej pracy sekwencje zostały zgłoszone do międzynarodowej bazy GenBank i są dostępne pod numerami od FN827057 do FN827097.

Dla niektórych sekwencji genotypu 1 obserwowano szczególnie wysokie podobieństwo. Pary próbek P1 i P2 oraz P16 i P17 zostały pobrane od kobiet ciężarnych z nieimmunologicznym obrzękiem płodu oraz w trakcie kordocentezy dodatkowo od ich

plodów. Dla każdej z par sekwencje analizowanego regionu genomu wirusa od matki i płodu były identyczne względem siebie.

Stwierdzono ponadto, że izolat P18 był identyczny z izolatami P16 i P17; pochodził od pacjenta hospitalizowanego na oddziale dziecięcym w tym samym mieście co P16 i P17. Wszystkie próbki pobrano w trakcie jednego sezonu infekcyjnego. Sekwencje P20 i P21 pochodziły od dawcy oraz biorcy szpiku kostnego i były względem siebie identyczne. Sekwencje identyczne lub różniące się w pojedynczych pozycjach nukleotydowych (podobieństwo 99,86–100%) izolowano od trzech pacjentów tego samego oddziału dziecięcego (P6, P7 i P8), których przed wystąpieniem objawów zakażenia hospitali-

zowano w tym samym czasie ze względu na podstawową chorobę hematologiczną.

4.2.3. Przebieg zakażenia genotypem 2 B19V

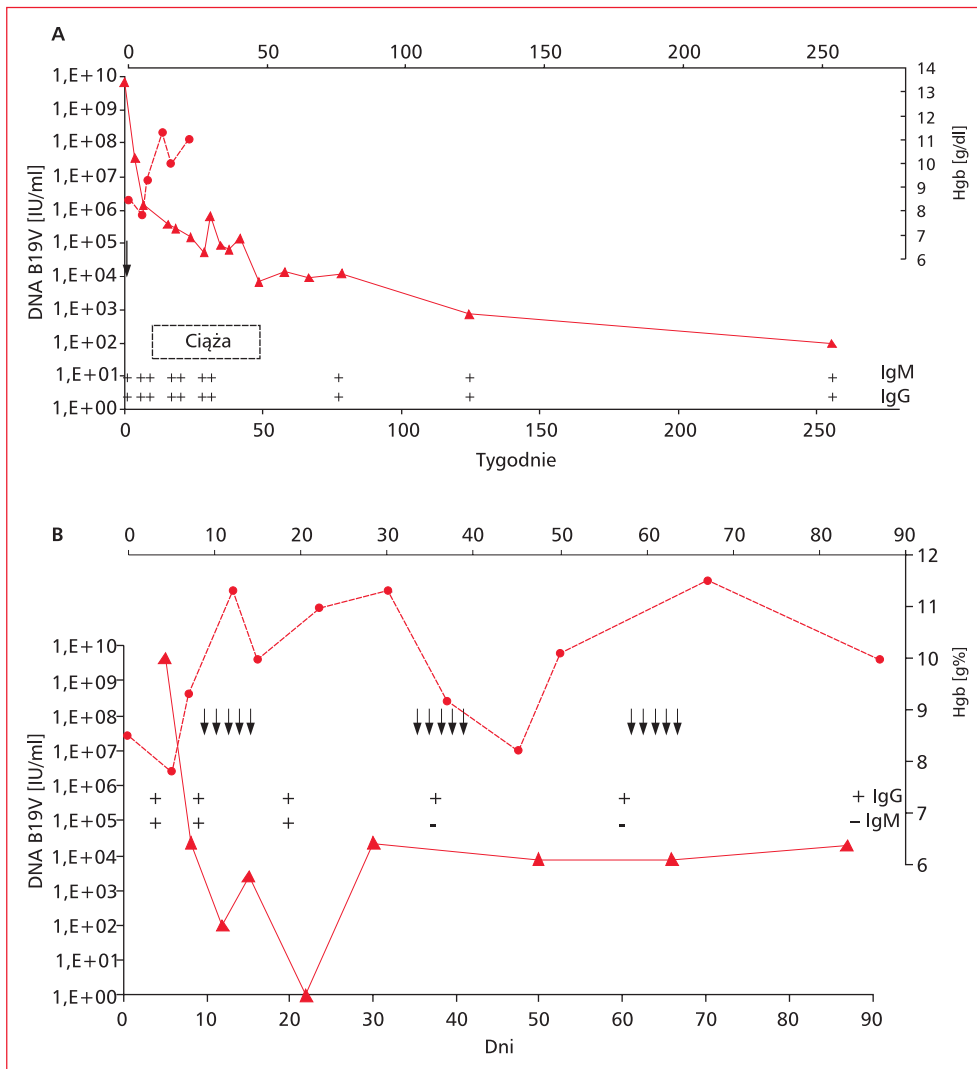
Na rycinie 8 przedstawiono przebieg zakażenia genotypem 2 u pacjentek P29 i P30. Pacjentka P29 (ryc. 8A) to kobieta w wieku 29 lat, która przeszła przeszczepienie nerki w listopadzie 2003 roku, a dawczynią narządu była 46-letnia kobieta. Po 4 miesiącach u chorej rozpoznano aplazję czerwono-krwinkową (liczba erytrocytów we krwi obwodowej (RBC) $2,67 \times 10^6/\mu\text{l}$) z niskim stężeniem hemoglobiny (Hb) i obniżoną liczbą retikulocytów (odpowiednio 7,6 g/dl i 0,5%). U pacjentki stwierdzono wysokie stężenia DNA wirusa ($\sim 10^{10}$ IU DNA B19V/ml) i jednocześnie wykryto swoiste przeciwciała anti-B19V klasy IgM i IgG. Ocena szpiku kostnego wykazała deplecję większości komórek linii erytroidalnej. Ze względu na potwierdzone zakażenie B19V, leczenie immunosupresyjne zmodyfikowano, zastępując takrolimus cyklosporyną. W okresie późniejszym obserwowano spadek poziomu wirusa (10^7 IU B19V DNA/ml) oraz normalizację parametrów hematologicznych (Hb > 10,2 g/dl oraz RBCs > $3,6 \times 10^6/\mu\text{l}$). Przez kolejnych kilka tygodni stężenie DNA B19V oscylowało wokół 10^5 IU/ml; w tym czasie zakażenie miało już przebieg bezobjawowy. Po 10 tygodniach od momentu zdiagnozowania infekcji, pacjentka zaszła w ciążę. Wnikliwe monitorowanie ultrasonograficzne płodu nie wykazało żadnych nieprawidłowości, które wskazywałyby na związek z zakażeniem B19V. Dziecko urodziło się zdrowe, w przewidywanym terminie. W okresie późniejszym u matki nie obserwowano epizodów reaktywacji wirusologicznej ani klinicznej zakażenia B19V. W tym przypadku DNA B19V było wykrywane łącznie przez 255 tygodni (5 lat). Swoiste przeciwciała zarówno klasy IgM, jak i IgG wykrywano w osoczu pacjentki przez cały ten czas. Przewlekłe zakażenie oraz brak typowej serokonwersji było zapewne wynikiem leczenia immunosupresyjnego.

Rycina 8B przedstawia drugi przypadek zakażenia genotypem 2, które miało miejsce u 18-letniej kobiety. W styczniu 2008 roku rozpoznano u niej białaczkę T-limfoblastyczną. Chorą leczono zgodnie z protokołem PALG-4 2002, a następnie protokołem reindukcyjnym (*reinduction protocol*) FLAM. Normalizację parametrów morfologii krwi obwodowej obserwowano w marcu, zaś 10 maja 2008 roku pacjentkę hospitalizowano z powodu wysokiej gorączki (40°C), wysypki, obrzęku i bóli stawów. Badanie morfologii krwi obwodowej wykazało pancytopenię: liczba białych krwinek (WBCs) — $0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$, krwinek czerwonych (RBCs) — $2,77 \times$

$\times 10^6/\mu\text{l}$, stężenie hemoglobiny Hb — 9,1 g/dl oraz liczba płytek (Plt) — $48 \times 10^3/\mu\text{l}$. W badaniu szpiku stwierdzono retikulopenię (retikulocyty — 0,08%). Stężenie materiału genetycznego wirusa wynosiło $4,6 \times 10^9$ IU DNA B19V/ml, jednocześnie wykryto przeciwciała anti-B19V klasy IgM i IgG. Pacjentce podawano dożylnie immunoglobuliny (IVIg Sando-globulin, 24 g/dzień przez 5 dni); w kolejnych dniach obserwowano obniżenie poziomu DNAemii w osoczu do około 10^2 IU/ml oraz ustąpienie gorączki, wysypki oraz bóli stawowych. W okresie późniejszym widoczna była sukcesywna normalizacja parametrów krwi obwodowej (dzień 7.: RBCs $2,35 \times 10^6/\mu\text{l}$, WBCs $1,94 \times 10^3/\mu\text{l}$, Plt: $190 \times 10^3/\mu\text{l}$; dzień 12.: RBCs $3,70 \times 10^6/\mu\text{l}$, WBCs $3,65 \times 10^3/\mu\text{l}$, Plt $251 \times 10^3/\mu\text{l}$, retikulocyty 4,21%). Przeciwciała anti-B19V, klasy IgM oraz IgG wykrywano do 15. dnia obserwacji. Do 30. dnia, tj. do końca okresu obserwacji markerów serologicznych zakażenia wykrywano wyłącznie przeciwciała klasy IgG. Ze względu na planowaną chemioterapię i przeszczepienie komórek hematopoetycznych, jeszcze dwukrotnie podano dożylnie immunoglobuliny (IVIg) w celu konsolidacji leczenia. W późniejszym okresie monitorowania nie obserwowano objawów zakażenia, chociaż DNA B19V było wykrywane łącznie przez 85 dni, aż do dnia śmierci pacjentki spowodowanej nawrotem białaczki. Badanie ostatniej dostępnej próbki wykazało 2×10^4 IU DNA B19V/ml.

5. Dyskusja

Obecna praca stanowi jedno z nielicznych polskich opracowań dotyczących epidemiologii molekularnej wirusa HBV, a zarazem pierwsze, w którym analizowano polimorfizm parwowirusa B19V. Unikalność badań dotyczących HBV polega na analizowaniu polimorfizmu u zakażonych dawców krwi z obszarów całego kraju. Warte podkreślenia jest również to, że badaniami objęto nie tylko osoby z wykrytym antygenem HBs, co było przedmiotem prac innych autorów, ale także dwie grupy osób zakażonych z wykrywalnym DNA HBV, lecz bez wykrywalnego antygeny HBs. Osoby HBsAg-ujemne/DNA HBV-dodatnie bez jakichkolwiek objawów klinicznych zakażenia zidentyfikowano dzięki wprowadzonym niedawno do krwiodawstwa badaniom przeglądowym DNA HBV. Pozwalają one identyfikować osoby z ukrytą formą zakażenia oraz osoby na wczesnym etapie zakażenia. Obie te grupy zostały uwzględnione po raz pierwszy w analizach porównawczych z nosicielami HBsAg, co pozwoliło uzyskać informacje o naturalnym przebiegu zakażenia w kontekście polimorfizmu na poziomie ge-



Rycina 8. Przebieg zakażenia genotypem 2 B19V u dwóch pacjentek leczonych immunosupresyjnie: **A.** pacjentka po przeszczepieniu nerki z aplazją czerwonych krwinek oraz **B.** pacjentka z białaczką, u której w momencie zdiagnozowania zakażenia B19V występowała gorączka, wysypka, obrzęk, bóle stawów oraz pancytopenia.

Na rycinie przedstawiono wykrywanie markerów wirusologicznych: poziom wirerii (DNA B19V) (▲-▲) oraz poziom przeciwciał. Pokazano także stężenie hemoglobiny (●-●). Na rycinie **A**, dotyczącej biorczyzny nerki uwidocznił moment zmiany leczenia immunosupresyjnego (↓); oraz okres kiedy pacjentka była w ciąży. Na rycinie **B** przedstawiającej zakażenie chorej na białaczkę pokazano trzy tury leczenia IVIG (24g Sandoglobuliny dziennie przez 5 kolejnych dni)(↓↓↓↓↓).

Figure 8. Course of B19V genotype 2 infection in two immunosuppressed women. **A.** Renal transplant patient with pure red cell aplasia and **B.** Leukemia patient with fever, rash, joint aches and anemia at the time of B19V diagnosis. Virological markers are indicated on the figure: viral loads (▲-▲) and antibody status. Levels of hemoglobin are also shown (●-●). In panel **A**, the transplant recipient, the change in the immunosuppressive regime is shown (↓); the time when the patient was pregnant is indicated. In panel **B**, the leukemia patient, three rounds of IVIG treatment (Sandoglobulin 24 g a day for 5 successive days) are shown (↓↓↓↓↓).

nomu. Dostęp do dużej liczby próbek z HBsAg umożliwił ponadto przeprowadzenie unikalnego porównania charakterystyki wirusologicznej osób zakażonych różnymi genotypami.

W zakresie badań dotyczących B19V, poza analizą epidemiologiczną występowania genotypów wirusa, dokonano wielu ważnych obserwacji na temat przebiegu zakażenia formami polimorficznymi,

o których znaczeniu klinicznym oraz sposobach leczenia nadal jeszcze niewiele wiadomo.

Analizy obu wirusów pozwoliły uzyskać cenne informacje na temat ich różnorodności, co ma istotne znaczenie dla prawidłowości oznaczeń diagnostycznych, które należy brać pod uwagę przy doborze metod oraz kontroli jakości zarówno przeglądowych badań wirusologicznych w krwiodawstwie, jak i w diagnostyce zakażeń tymi wirusami u chorych.

5.1. HBV

Wcześniejsze badania dotyczące częstości występowania w Polsce genotypów HBV prowadzono u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B leczonych w klinikach zakaźnych w Warszawie oraz w Gdańsku [20, 21, 23]. W niniejszej pracy analizowano wyniki badania próbek z HBsAg reprezentatywnych dla całego kraju. Wykazano, że dawcy z HBsAg zakażeni są przede wszystkim genotypem A2 (80,5%) oraz że częstość zakażeń tym genotypem różni się w zależności od regionu kraju i jest generalnie wyższa w części zachodniej. Zarówno u pacjentów dorosłych, jak i dzieci z WZW typu B stwierdzano także większą częstość zakażeń genotypem A niż genotypem D (u dzieci odpowiednio 86,5% i 13,5% [22], u dorosłych 77%–86,6% oraz 15,7%–19% [20, 21, 23]). Sekwencjonowanie informatywnych regionów genomu wirusa pozwoliło na identyfikację podtypów A2 oraz D1 i D2. Podtyp A2 uważany jest za charakterystyczny dla Europy Zachodniej, jednak wyniki obecnych badań potwierdzają, że właśnie w Polsce obserwuje się jedną z najwyższych częstości występowania tej formy polimorficznej. Porównywalnie wysoki odsetek (73%) odnotowuje się u naszych południowych sąsiadów, Czechów [107]. Genotyp ten jest rzadziej identyfikowany wśród nosicieli HBsAg na Węgrzech czy w Niemczech [23], gdzie jedną trzecią zakażonych HBV objętych badaniami epidemiologii molekularnej stanowiły osoby pochodzenia tureckiego, o nieustalonym miejscu urodzenia i źródłach zakażenia. W porównaniu z zachodnim sąsiadem Polska jest krajem stosunkowo jednolitym pod względem etnicznym, z niewielkim napływem obcokrajowców, aczkolwiek ostatnio obserwuje się w tym względzie zmiany, których konsekwencją może być pojawienie się nowych genotypów dotychczas, dominujących na innych kontynentach. Jako przykład może posłużyć genotyp C identyfikowany u imigrantów z Azji (dane ze szpitala Zakaźnego w Kielcach, prof. W. Kryczka, w trakcie opracowania). U naszych wschodnich sąsiadów proporcja zakażeń genotypami A i D jest odwrotna niż w Polsce. Na Białorusi dominuje genotyp D (88,6%), genotyp A2 jest iden-

tyfikowany u 11,2% zakażonych [108]; podobnie nosiciele HBsAg z krajów dawnego ZSRR najczęściej zakażeni są genotypem D [109]. Genotyp D2 uważa się za charakterystyczny dla Północnej Euroazji, zaś genotyp D1 dla obszarów Środkowego Wschodu. Oba podtypy są ze sobą blisko spokrewnione [110]. Na wschód od Polski występują dodatkowo podtypy D3 oraz D4, których na razie w Polsce nie stwierdzono [108, 109].

W niniejszej pracy dodatkowo analizowano polimorfizm HBV we wczesnym etapie zakażenia oraz u dawców z ukrytym zakażeniem (OBI). W przypadku osób zakażonych na wczesnym etapie zakażenia identyfikowane były genotypy obecne u nosicieli HBsAg, w obu grupach ich proporcja była podobna, aczkolwiek ze względu na małą liczebność osób z wczesnym zakażeniem takiego porównania nie można uznać za miarodajne. Inaczej wygląda częstość genotypów występujących u dawców z ukrytym zakażeniem HBV, u których dominuje genotyp D (62,5%). Należy zauważyć, że dawcy z OBI są starsi od dawców z HBsAg (mediana wieku 51 *v.* 21 lat). Istotne różnice w dystrybucji genotypów obserwowano także w Południowej Afryce. U dawców — nosicieli HBsAg dominuje tam genotyp A (90%), a 10 razy rzadziej występuje zakażenie genotypem D. Z kolei u dawców z OBI udział zakażeń genotypem A jest istotnie mniejszy i wynosi 77%, natomiast blisko dwukrotnie większa jest częstość występowania genotypu D [111]. W krajach Europejskich, gdzie u nosicieli HBsAg najczęściej identyfikuje się genotyp A2, u dawców z OBI obserwuje się relatywnie większą częstość występowania zakażeń genotypem D. Ponadto, w tym typie zakażenia dochodzi do nagromadzenia największej liczby mutacji prowadzących do substytucji aminokwasowych w HBsAg, zwłaszcza w regionie MHR. Szczególnie w przypadku genotypu D widać znaczną liczbę zmian w obrębie struktur epitopów istotnych dla odpowiedzi immunologicznej. Zjawisko to uważa się za efekt presji immunologicznej stanowiącej potencjalnie główną przyczynę ukrytego zakażenia HBV [59]. W przypadku innych form polimorficznych, takich jak podtyp A1 [111] oraz genotyp B i C [112] sugeruje się inne mechanizmy prowadzące do ukrytego zakażenia HBV. Do alternatywnych przyczyn OBI zalicza się delecje, insercje oraz mutacje prowadzące do powstania kodonu stop, mutacje w sekwencjach regulatorowych genu kodującego antygen rdzeniowy wirusa oraz upośledzenie mechanizmów replikacji HBV [112].

Pomimo przebadania znacznej liczby próbek z HBsAg reprezentatywnych dla obszaru całego kraju nie zidentyfikowano przypadków zakażenia

genotypem H, które wykrywano sporadycznie we wcześniejszych badaniach u pacjentów z północy Polski [20]. Natomiast zidentyfikowano zakażenie tym typowym dla Ameryki Południowej i Środkowej genotypem HBV [113, 114] u dwóch dawców z ukrytym zakażeniem HBV (OBI). We wcześniejszym opracowaniu Bielawski i wsp. sugerował, że obecność tego genotypu u pacjentów gdańskiego szpitala może być tłumaczona przez portowy charakter miasta i większą mobilność jego mieszkańców [20]. W obu obecnie zidentyfikowanych przypadkach genotypu H zakażeni nie pochodzili z północnej Polski. Choć nie ma do dyspozycji danych dotyczących potencjalnych źródeł i miejsca zakażenia, nie można wykluczyć, że w tych dwóch obecnie zidentyfikowanych przypadkach do zakażenia doszło w czasie podróży do odległych regionów, gdzie częstość występowania tego genotypu jest wysoka. Jednak warto zwrócić uwagę na fakt, że genotyp H jest niemal niespotykany w innych społeczeństwach Europejskich, których przedstawiciele częściej podróżują po świecie, w tym do Ameryki Południowej i Środkowej [23, 115–117].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o zidentyfikowaniu w Japonii pojedynczych przypadków bezobjawowego zakażenia dawców krwi genotypem H, które zidentyfikowano u nich w okienku serologicznym, jak również o wykryciu ostrego i przewlekłego zakażenia tym genotypem u chorych z objawami klinicznymi [118–120]. Nie wiadomo, jakie jest pochodzenie zakażeń tym typem wirusa w Japonii. Stwierdzono jedynie, że w jednym z tych przypadków do zakażenia doszło najprawdopodobniej na obszarze Azji Kontynentalnej. Obecnie zidentyfikowane polskie przypadki wymagają dalszych badań, między innymi sekwencjonowania całego genomu w celu lepszej charakterystyki i potwierdzenia wstępnej klasyfikacji do genotypu H oraz wykluczenia potencjalnych rekombinacji. Obecnie prowadzone są w IHiT badania polimorfizmu HBV u kolejnych nosicieli HBsAg, zarówno chorych, jak i bezobjawowych dawców. W trakcie tych badań zidentyfikowano metodą InnoLIPA, a następnie potwierdzono przez sekwencjonowanie genu S, zakażenie genotypem H u kolejnych dwóch dawców oraz u dwóch chorych. Zakażeni pochodzą z centralnej i południowej Polski (wyniki w trakcie opracowywania).

Występowanie zakażenia genotypem A2 oraz D w Polsce stworzyło okazję do porównania parametrów wirusologicznych w zależności od genotypu. Ważnym z praktycznego punktu widzenia zagadnieniem jest korelacja stężenia HBsAg i DNA HBV w osoczu zakażonych osób. Ocena ilościowa drugiego markera jest uznanym, informatywnym parametrem

uwzględnianym przy podejmowaniu decyzji o rozpoczęciu leczenia przeciwwirusowego oraz wykorzystywanym do oceny przebiegu infekcji. Informatywność i znaczenie ilościowego badania HBsAg są nadal dyskutowane. W obecnych badaniach nie obserwowano korelacji pomiędzy stężeniem HBsAg a DNA wirusa, ani w przypadku genotypu A2, ani D. We wcześniejszych opracowaniach [121, 122] nie obserwowano korelacji HBsAg i DNA w próbkach dawców z HBsAg pochodzących ze Stanów Zjednoczonych (zakażonych przede wszystkim genotypem A2) oraz ze Wschodniej Afryki (zakażonych głównie genotypem E).

Obserwowano tendencje do niższego stężenia zarówno HBsAg, jak i DNA HBV w osoczu polskich krwiodawców zakażonych genotypem D w porównaniu z dawcami zakażonymi genotypem A2. Ponadto, analiza współczynnika ilości HBsAg/DNA wirusa wykazała, że rozkład tego parametru w genotypie D był szerszy, z większą liczbą skrajnych wartości względem mediany (wartości wysokie i bardzo niskie). Mediana współczynnika koncentracji HBsAg i DNA HBV wyrażonych w IU/ml została oszacowana na poziomie wartości około jeden. Zgodnie z wcześniejszymi publikacjami [123] 1 IU HBsAg zawiera około 0,58 ng HBsAg lub $1,16 \times 10^7$ cząsteczek HBsAg. Jedna IU/ml DNA HBV zawiera około 5 kopii genomu wirusa [124]; każdy genom otoczony jest przez 2,3 M cząsteczek antygeny powierzchniowego. Pozostały nadmiar cząsteczek HBsAg krąży w osoczu w postaci niezwiązanej z wirionami. W przypadku, trzech próbek prezentowanych w tej pracy (2 genotypu D, 1 genotypu A2) o wartości współczynnika ilości HBsAg/DNA HBV $< 10^{-7}$, wydaje się, że wykrywalny HBsAg należy głównie do wirionów. Korelacja obserwowana u dawców krwi we wczesnej fazie infekcji [125] sugeruje różną dynamikę tworzenia cząstek wirusowych w ostrej i przewlekłej fazie zakażenia. Wskazuje również na to, że w okresie tak zwanego „okienka serologicznego” większość wyprodukowanych cząsteczek białek jest wykorzystywana do budowania wirionów. Te dane sugerują, że w trakcie przewlekłej infekcji mechanizmy kontrolujące replikację wirusa oraz produkcję antygeny powierzchniowego są niezależne.

W niektórych badaniach prowadzonych nad HBsAg u przewlekle zakażonych chorych obserwowano korelacje stężenia antygeny powierzchniowego i DNA HBV w osoczu. Korelacja taka utrzymywała się jednak tylko wówczas, gdy analizowano próbki pochodzące od tego samego pacjenta [126–128]. Stąd wniosek, że badanie ilości antygeny powierzchniowego może być użytecznym narzędziem w praktyce klinicznej, między innymi może służyć

do oceny skuteczności leczenia. Jaroszewicz i wsp. stwierdzili ostatnio korelację stężenia HBsAg i DNA HBV w osoczu w trakcie ostrego zapalenia wątroby typu B; korelacja ta jednak słabła w fazie przewlekłej. Związek stężenia obu markerów HBV obserwowano dla genotypu A, ale nie dla genotypu D [129]. W obecnych badaniach współczynnik korelacji nie był istotny dla zakażenia genotypem D, ale miał wyższą wartość niż dla genotypu A.

Kolejnym szczegółowym zagadnieniem analizowanym w obecnym opracowaniu dotyczącym polimorfizmu HBV i mającym związek z HBsAg jest polimorfizm genu kodującego ten antygen. W prezentowanych badaniach polimorfizmu regionu pre-S/S u nosicieli HBsAg nie stwierdzono korelacji pomiędzy obecnością delekcji lub mutacji w kodonie inicjującym syntezę poszczególnych białek a stężeniem antygeny w surowicy. Stężenie HBsAg w 7 z pośród 9 próbek z tak zmienionym kodonem startowym było zgodnie wysokie ($7,7 \times 10^3$ do $2,4 \times 10^4$ IU/ml). Oznacza to, że zsekwencjonowany produkt PCR dostarcza informacji jedynie o dominującym szczepie defektywnym, zaś szczepy całkowicie funkcjonalne pozostają w mniejszości, chociaż wystarczają do produkcji odpowiedniej ilości białka powierzchniowego.

Sekwencja białka powierzchniowego dawców HBsAg dodatnich większości izolatów była typu dzikiego; w regionie MHR taki charakter miało 82,4% szczepów. Jednak, gdy analizowano strukturę tego regionu kodowaną przez sekwencje izolowane od dawców z ukrytym zakażeniem częstość dzikich odmian była blisko dwukrotnie mniejsza (46%). Na podstawie analizy sekwencji MHR genu S zidentyfikowano wiele substytucji aminokwasowych o potencjalnym znaczeniu klinicznym (tab. 5). Podejrzuje się, że wiele z nich jest konsekwencją mutacji ucieczki [25], jednakże pełne udokumentowanie osłabienia oddziaływań antygeny powierzchniowego ze specyficznymi przeciwciałami wymaga obserwacji tego zjawiska nie tylko w trakcie badania paneli rozcieńczeń próbek klinicznych, ale również potwierdzenia badaniami paneli rozcieńczeń antygenów rekombinowanych. W ten sposób potwierdzono znaczenie dla diagnostyki HBV niektórych substytucji wykrytych obecnie — M133T, S143L, D144A oraz G145A. W wyniku dwóch pierwszych mutacji dochodzi do powstania antygeny, którego reaktywność jest istotnie obniżona w testach powszechnie stosowanych do badania dawców, co może prowadzić do wyników fałszywie ujemnych [24, 103, 130–132]. W izolacie P122 stwierdzono podstawienia P120 i D144. W próbce, z której pochodziła ta sekwencja stwierdzono śladowe stężenia

zarówno HBsAg (0,12 IU/ml), jak i DNA (< 5 IU/ml). Izolat ten został zaklasyfikowany do genotypu D i obecnością licznych mutacji jest bardzo podobny do sekwencji izolowanych od dawców z OBI [58, 59].

Dane dotyczące szczepienia badanych dawców mają charakter fragmentaryczny. Częstość immunizowanych osób, wśród dawców HBsAg dodatnich (22,2%), od których uzyskano informacje na ten temat, jest nieznacznie wyższa niż u dorosłych powyżej 20. roku życia, wśród których ponad 15% było zaszczepionych w 2004 roku [133]. Dane te częściowo tłumaczą względnie częste występowanie substytucji aminokwasowych w regionie MHR białka S. Należy zauważyć że, tego typu zmiany sekwencji aminokwasowych były istotnie statystycznie częstsze w przypadku genotypu D niż genotypu A. We wcześniejszych badaniach wykazano, że substytucje zlokalizowane w omawianym regionie są związane z presją immunologiczną, zarówno naturalną, jak i wywołaną szczepieniem [134–136].

W chwili obecnej nie ma jasnej odpowiedzi na pytanie, jakie czynniki genetyczne wpływają na tempo replikacji wirusa. Jednym z branych pod uwagę czynników jest polimorfizm regionu BCP. W obecnych badaniach nie stwierdzono związku pomiędzy stężeniem DNA HBV a występowaniem mutacji w pozycji 1762 i 1764 łącznie lub osobno. Okazało się również, że inne mutacje w promotorze, uznane za czynnik wpływający na poziom replikacji na podstawie badań na modelach komórkowych [43], nie korelują ze stężeniem DNA w osoczu zakażonych dawców.

Kolejną intrygującą obserwacją wynikającą z przeprowadzonej obecnie charakterystyki wirusologicznej nosicieli HBsAg jest niska częstość wykrywania HBeAg (10%) w porównaniu z zakażonymi dawcami z innych krajów. Nosicielami tego antygeny jest 27% dawców szkockich, zakażonych przede wszystkim genotypem A i D; 31,5% dawców na Tajwanie zakażonych genotypem B i C oraz 34% dawców z Ghany zakażonych głównie genotypem E [94, 116, 137]. Jedną z przyczyn obserwowanych różnic może być wysoka częstość mutacji w BCP/PC u polskich krwiodawców z HBsAg, które zmniejszają lub nawet całkowicie hamują syntezę HBeAg.

5.2. B19V

W niniejszych badaniach, które obejmowały chorych zakażonych B19V z objawami klinicznymi, zidentyfikowano dwa genotypy — dominujący był genotyp 1; dodatkowo zidentyfikowano zakażenie genotypem 2. Jest to pierwszy opis zakażenia genotypem 2 nie tylko w Polsce, ale także w Europie Środkowo-Wschodniej. Przedstawione dane sugerują

rują, że w Polsce genotyp 2 może być odpowiedzialny za znaczącą część ostrych objawowych zakażeń, w szczególności u osób z osłabioną odpornością. Podobny przypadek zakażenia genotypem 2 u chorego po przeszczepieniu nerki opisał Liefeldt i wsp. [138]. U pacjenta z Niemiec obserwowano przewlekłą wiremę, okresowo osiągającą bardzo wysokie stężenie, której towarzyszyła przewlekła anemia [138]. Wszystkie trzy przypadki zakażenia genotypem 2 — dwa opisane w obecnej pracy oraz jeden opisany przez Liefeldt i wsp. [138] — zlokalizowano w miejscach położonych niedaleko od siebie. Może to przemawiać za hipotezą krążenia wariantów B19V na ograniczonych obszarach geograficznych; w tym przypadku na terenie Polski i południowo-wschodnich Niemiec.

Hübschen i wsp., w trakcie badania polimorfizmu wirusa B19 wykrywanego u chorych z wysypką i gorączką pochodzących z Południowo-Wschodniej Europy [139], zidentyfikowali dwa przypadki zakażenia genotypem 3b (w Grecji i Bułgarii) a żadnego genotypem 2. Autorzy twierdzą, że wyniki te świadczą o rozprzestrzenianiu się genotypu 3b z Afryki do Europy. Polimorfizm tego samego fragmentu genomu B19V, jaki poddano analizie w obecnej pracy został przebadany przez Ermoloicha i wsp. na próbkach od 84 osób z rumieniem zakaźnym pobranych podczas epidemii na Białorusi w 2006 roku. Zidentyfikowano wyłącznie zakażenia podtypami 1a i 1b [140].

Prezentowane w niniejszej pracy obserwacje dotyczące przebiegu klinicznego zakażenia genotypem 2 istotnie wzbogacają dotychczasową bardzo ograniczoną wiedzę na temat znaczenia klinicznego genotypów innych niż genotyp 1. W niniejszej pracy, w trakcie zakażenia genotypem 2, obserwowano objawy kliniczne typowe dla zakażenia B19V u chorych z osłabioną odpornością, w tym chorych leczonych immunosupresyjnie [87, 138, 141, 142]. Nie ma w tym nic zaskakującego, ponieważ badania zaprojektowano po to, by ocenić występowanie odmian polimorficznych wśród pacjentów z objawami sugerującymi zakażenie B19V. Zakażenie genotypem 2. u biorczyni przeszczepionej nerki nie manifestowało się objawami klinicznymi w trakcie ciąży. Najprawdopodobniej było to wynikiem obecności przeciwciał o charakterze neutralizującym, a nie brakiem potencjału patogennego wariantu B19V względem płodu.

Jak już wspomniano we wstępie, diagnozowanie zakażenia genotypem 2 za pomocą niektórych testów może dać wyniki fałszywie ujemne [8–12, 74]. Obecne badania pokazują, że stosowanie odpowiednich metod wykrywania materiału genetycznego B19V, zwłaszcza w przypadku pacjentów z osła-

bioną odpornością, ma niezwykle istotne znaczenie także w Polsce. Wyniki badania autorów niniejszej pracy pokazują, że brak wykrywalnych przeciwciał skierowanych do B19V u chorych z osłabioną odpornością jest zjawiskiem częstym. Fakt ten wstępnie sygnalizowali inni autorzy [138, 141, 143]. W związku z powyższym, w diagnostyce zakażenia B19V zwłaszcza u chorych z osłabioną odpornością należy stosować metody bezpośredniej detekcji materiału genetycznego wirusa (np. *real-time* PCR) uprzednio sprawdzone pod kątem wykrywania wszystkich znanych form polimorficznych.

W niniejszych badaniach genotyp 2 stwierdzono u znaczącego odsetka badanych. Wcześniej, obecność DNA genotypu 2 stwierdzono w 2,5% preparatów czynników krzepnięcia produkowanych z osocza; w starszych koncentratkach częściej niż w wyprodukowanych ostatnio [144]. Tę formę polimorficzną B19V identyfikowano, aczkolwiek bardzo rzadko, w pojedynczych próbkach od dawców oraz w pulach osocza przeznaczonego do frakcjonowania [11, 71]. Genotyp 2 identyfikowano sporadycznie u pacjentów we Francji [67], Anglii [10], we Włoszech [145], w Niemczech [138, 146], Stanach Zjednoczonych [66, 147], Brazylii [148], w Wietnamie [68] i Południowej Afryce [70]. W większości tych przypadków obserwowano przewlekłe zakażenie charakteryzujące się niską wiremą lub/i obecnością DNA B19V w tkankach innych niż krew i występowało na ogół u starszych osób [68, 145, 146, 148]. Analiza częstości wykrywania genotypów B19V w szpiku kostnym, skórze, wątrobie w zależności od wieku pacjentów pozwoliła na sformułowanie hipotezy, że w przedziale czasowym 1930–1970 zarówno genotyp 1, jak i 2 były w podobnej proporcji szeroko rozpowszechnione w północnej i środkowej Europie. W badaniach próbek surowic gromadzonych w latach 80. i 90. potwierdzono zanikanie genotypu 2 w tym okresie [149]. Norja i wsp. [150] sugerowali, że niewielka liczba zakażeń genotypem 2 rejestrowana ostatnio w Europie może raczej wynikać z reaktywacji wirusa u przewlekłe zakażonych osób lub z przeniesienia zakażenia od takich osób, na przykład przez transfuzję, a nie jest efektem epidemicznego szerzenia się tego genotypu w populacji. W przytoczonym przypadku biorczyni nerki nie ma żadnych informacji na temat transfuzji. Nie można natomiast wykluczyć przeniesienia zakażenia genotypem 2 wraz z przeszczepem od przewlekłe zakażonej 46-letniej dawczyni tej nerki. Podobną drogę przeniesienia B19V opisali wcześniej Yango i wsp. [87]. U zakażonej genotypem 2 pacjentki chorej na białaczkę wystąpiły objawy zakażenia, przy czym na dwa miesiące przed ich wystąpieniem nie

przetaczano jej ani krwi, ani żadnego składnika krwi. Należy zatem przypuszczać, że nie jest to przypadek reaktywacji przewlekłego zakażenia wirusem przeniesionym przez krew albo przeszczep od dawcy, a można raczej sugerować aktualne krążenie tego genotypu w populacji.

W niniejszych badaniach obserwowano przewlekłą wiramię, która trwała maksymalnie przez co najmniej ~2,5 i ~5 lat odpowiednio dla pacjentów z prawidłową oraz osłabioną odpornością. Podobne obserwacje opisywali także inni autorzy [86, 138, 142, 151–154]. Kurzman i wsp. wykazali, że przewlekłe zakażenie może być ściśle związane z niewystarczającą produkcją swoistych przeciwciał (niedobór ilościowy) lub brakiem własności neutralizujących (deficyt funkcjonalny) [155]. Stwierdzono także, że u osób, w osoczu których DNA B19V wykrywa się dłużej, dominuje produkcja przeciwciał do antygenów strukturalnych, a nie NS1, co sugeruje potencjalny mechanizm utrzymywania zakażenia [156]. Wobec powszechnego wykrywania bardzo czułymi metodami materiału genetycznego B19V, zwłaszcza w tkankach, obecnie uważa się, że wirus nie jest całkowicie usuwany z organizmu [78]. W przypadku zakażonej genotypem 2 pacjentki po przeszczepieniu nerki, brak ograniczenia zakażenia był związany głównie z leczeniem immunosupresyjnym, osłabiającym przeciwwirusową odpowiedź immunologiczną typu humoralnego. W efekcie nie obserwowano zaniku przeciwciał IgM, który zazwyczaj ma miejsce wkrótce po pojawieniu się przeciwciał IgG. Podobnie, przedłużające się do około 2,5 roku, zakażenie genotypem 2 obserwowano u wspomnianego chorego po przeszczepieniu nerki pochodzącego z Niemiec, u którego zwiększona aktywność replikacyjna prowadziła do wzrostu poziomu wirerii nawet do $4,2 \times 10^{11}$ IU/ml z jednoczesnym pogłębianiem się niedokrwistości [138].

Niezwykle istotnym aspektem badań molekularnych i analiz polimorfizmu są zagadnienia epidemiologiczne. W trakcie przeprowadzonych badań zidentyfikowano prawdopodobne przeniesienie zakażenia genotypem 1 z matki na płód, ale również przeniesienie tych samych sekwencji z dawcy na biorcę szpiku kostnego (szczegóły kliniczne zostały wcześniej opisane przez Wąsak-Szulowska i wsp. [86]) na jednym oddziale hematologii dziecięcej, a nawet w trakcie jednego sezonu epidemicznego u pacjentów zamieszkujących ten sam region. Przedstawione wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące szczepów izolowanych od pacjentów z objawami rumienia zakaźnego lub z przejściową kryzą aplastyczną. Krążący w czasie epidemii parvovirus B19 wykazywał wysokie podobieństwo na poziomie genomu, sięgające nawet 100% [157, 158].

Ponieważ sezonowe epidemie B19V występują regularnie co 3–5 lat, istnieje potencjalne prawdopodobieństwo zmian epidemiologii genotypów wirusa. Obecnie nie ma podstaw, aby wykluczyć epidemiczne szerzenie się genotypu 2 w Europie Środkowo-Wschodniej w przyszłości lub na innych obszarach, tak jak się to obserwuje w przypadku genotypu 1. Jeśli jednak przyjąć wspomnianą wcześniej hipotezę dotyczącą wypierania w Europie genotypu 2 przez genotyp 1 (*die out theory*) należy przypuszczać, że musi istnieć przyczyna takiego zjawiska. Do „faworyzowania” jednej z form polimorficznych mogą przyczyniać się jej własności biologiczne. Stwierdzono między innymi różnice pomiędzy genotypem 1 i 2 w organizacji promotora, jednak nie ma na razie dowodów, że taka cecha preferuje formę klasyczną. Servant i wsp. obserwowali zakażenie genotypem 2 i 3 głównie u starszych osób i leczonych immunosupresyjnie. Sugerowała, że u osób starszych w trakcie zakażenia genotypem 2 uruchamiana jest wtórna odpowiedź immunologiczna będąca konsekwencją wcześniejszej infekcji genotypem 1 i nie jest ona wystarczająca, aby zapobiec zakażeniu niedawno odkrytym podtypem [67]. Obecnie brak nowych danych na potwierdzenie takiej hipotezy, wiadomo natomiast, że diagnostycznymi testami immunoenzymatycznymi opracowanymi dla genotypu 1 można wykryć przeciwciała skierowane do innych typów wirusa oraz postulowano zaliczenie wirusów należących do różnych genotypów do tego samego serotypu [72, 159].

Należy podkreślić istotne znaczenie jakie ma wykrywanie takich samych genetycznie szczepów u osób zamieszkujących tereny epidemii. Wysokie prawdopodobieństwo zakażenia drogą kropelkową powinno być brane pod uwagę przy interpretacji wyników badania polimorfizmu podczas analizy dróg przenoszenia na przykład przez składniki krwi i razem z przeszczepianymi tkankami. W przypadku wirusa przeniesionego drogą kropelkową nie można całkowicie wykluczyć przeniesienia wirusa w wyniku kontaktu z osobą zakażoną w trakcie cyklicznej epidemii.

W obecnej pracy przedstawiono wyniki badań polimorfizmu dwóch wirusów przenoszonych przez krew — HBV i B19V. Oba badane są u dawców krwi, choć w różnym zakresie. Wykazano dominujące zakażenia genotypem A2 oraz genotypem 1 odpowiednio u zakażonych HBV oraz B19V. Standardy międzynarodowe stanowiące optymalny materiał referencyjny do oceny czułości testów przeglądowych i diagnostycznych wykrywających HBsAg oraz DNA B19V zakażone są właśnie tymi formami polimorficznymi. Należy jednak podkreślić, że

w prezentowanej pracy przeprowadzonej na reprezentatywnej liczbie osób zakażonych stwierdzono znaczący odsetek zakażeń innymi genotypami. Genotyp D HBV wydaje się niezwykle istotny ponieważ wykazuje znacząco większy polimorfizm dotyczący regionu HBsAg, który jest reaktywny w badaniach diagnostycznych prowadzonych metodami serologicznymi. W przypadku B19V stwierdzono krążenie genotypu 2 w populacji. Zakażenie tą formą polimorficzną jest obciążone ryzykiem wyniku fałszywie ujemnego lub zaniżonego wyniku badania ilościowego DNA wirusa. Identyfikacja tych form polimorficznych oraz ich potencjalne znaczenie wskazują na konieczność brania ich pod uwagę przy doborze testów i w kontroli jakości badań diagnostycznych.

W związku z tym, wspomniane genotypy są uwzględniane przy walidacji nowych testów wprowadzanych do polskiego krwiodawstwa oraz w panelach kontroli jakości zarówno badań HBsAg, jak i DNA B19V przygotowywanych przez IHiT w celu walidacji badań przeglądowych prowadzonych w regionalnych centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa. Zyskuje się tym samym pewność, że stosowane testy wykrywają formy polimorficzne, które występują w populacji rzadziej niż formy dominujące, ale mogą stanowić źródło trudności diagnostycznych, w konsekwencji czego może dojść do zakażenia osób ciężko chorych przez krew lub jej składniki.

W prezentowanych badaniach molekularnej epidemiologii HBV wykorzystano materiał zebrany przez polską służbę krwi. Wyniki te są istotne, ponieważ stanowią ważne źródło wiedzy pozwalające ocenić zmiany w częstości mutantów HBV, zwłaszcza wśród osób zakażonych, a nie poddanych wcześniejszemu leczeniu. Z dotychczasowych doniesień wynika, że w krajach z wysoką zapadalnością na WZW typu B, w pierwszych latach prowadzenia powszechnego programu immunizacji wśród zakażonych HBV nastąpił wzrost częstości zakażeń mutantami [160]. Szeroką akcję szczepień podjęto także w Polsce i nadal jest ona prowadzona. Począwszy od roku 2007 roku w Polsce zaczęli oddawać krew młodzi ludzie, których uprzednio objęto szczepieniami w ponad 90% [133]. W związku z tym, monitorowanie polimorfizmu HBV, zwłaszcza w genie S, będzie miało szczególne znaczenie z punktu widzenia zdrowia publicznego.

6. Podsumowanie i wnioski

Najważniejsze obserwacje

1. U polskich dawców krwi zakażonych HBV identyfikowano genotyp A (podtyp A2) i D (podtypy D1 i D2) oraz H.

2. Rozkład częstości genotypów u osób z ukrytym zakażeniem był odmienny od obserwowanego w grupach z antygenem HBs oraz u osób we wczesnym okresie zakażenia — u dawców we wczesnym okresie zakażenia oraz z HBsAg dominowało zakażenie genotypem A, natomiast u dawców z OBI więcej osób było zakażonych genotypem D i sporadycznie identyfikowano genotyp H.
3. W izolatach genotypu D istotnie częściej niż A występowały substytucje aminokwasowe potencjalnie mające wpływ na przebieg zakażenia oraz skuteczność profilaktyki i diagnostyki zakażeń HBV.
4. Mutacje w regionie pre-C i BCP nie korelowały ani ze stężeniem HBsAg, ani z DNA HBV w osoczu.
5. U osób objawowo zakażonych B19V dominował podtyp 1b, sporadycznie identyfikowano genotyp 2, ale wyłącznie u pacjentów z osłabioną odpornością.
6. Przebieg zakażenia genotypem 2 B19 był taki sam jak w przypadku genotypu 1.

Wnioski

Dobór testów diagnostycznych, ich walidacja oraz inne formy kontroli jakości badań HBV i B19V prowadzonych zarówno u dawców krwi, jak i chorych powinny uwzględniać, oprócz najpowszechniej występujących u osób zakażonych genotypu A HBV oraz genotypu 1 B19V, również rzadziej występujące genotypy, odpowiednio, D i H oraz genotyp 2. Wyniki obecnych badań nie potwierdzają całkowitego zaniku genotypu 2 B19V w Polsce, natomiast są zgodne z wcześniejszymi informacjami o występowaniu zakażenia genotypem H HBV w naszym kraju. Przebieg zakażenia genotypem 2 B19V u chorych leczonych immunosupresyjnie jest podobny jak w przypadku zakażenia genotypem 1 B19V. U osób z genotypem D HBV stwierdzono większy niż w przypadku genotypu A polimorfizm w regionie kodującym epitopy kluczowe dla wiązania antygeny HBs przez przeciwciała (neutralizujące), co ma potencjalne znaczenie dla prawidłowości diagnostyki metodami serologicznymi oraz dla skuteczności profilaktyki wykorzystującej szczepienia ochronne oraz immunoglobuliny anty-HBs.

7. Podziękowania

Serdecznie dziękuję Uczestnikom badań przedstawionych w opracowaniu: współpracownikom z Zakładu Wirusologii IHiT, a w szczególności mgr Ewie Sulkowskiej, mgr Aleksandrze Kalińskiej

oraz mgr Grzegorzowi Liszewskiemu; pracownikom Regionalnych Centrów Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, którzy uczestniczyli w badaniach w ramach Polskiej Grupy Badania Wirusów Przenoszonych przez Krew; profesorowi Jean-Pierre Allain oraz dr Penelope Garmiri (Uniwersytet Cambridge, UK), dr Sally Baylis (Instytutu Paula Ehrlicha, Niemcy), dr Annie Ejduk (IHiT), dr Renacie Wieczorek (Szpital Wojewódzki w Poznaniu), dr Sydonii Gołębiowskiej-Staroszczyk oraz profesorowi Michałowi Matysiakowi (Warszawski Uniwersytet Medyczny). Pani profesor Magdalenie Łętowskiej (IHiT) dziękuję za wytrwałą zachętę do podnoszenia kwalifikacji naukowych. Szczególnie serdecznie pragnę wyrazić wdzięczność Pani profesor Ewie Brojer (IHiT), mojemu Nauczycielowi pracy naukowej w zakresie wirusologii.

Piśmiennictwo

1. Łętowska M. (red.) *Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników w wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi*. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2006 (wersja 4, 2010).
2. Anonymous: Council of Europe: Human anti-D immunoglobulin, monograph 0557; In *European pharmacopoeia*, 6th edn. Strasbourg, France, Council of Europe, 2008.
3. Anonymous: Council of Europe: Human anti-D immunoglobulin for intravenous administration, monograph 1527; In *European Pharmacopoeia*, 6th edn. Strasbourg, France, Council of Europe, 2008.
4. Anonymous: Council of Europe: Human plasma (pooled and treated for virus inactivation), monograph 1646; In *European pharmacopoeia*, 6th edn. Strasbourg, France, Council of Europe, 2008.
5. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P. i wsp. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336 (8711): 325–329.
6. Carman W.F., Trautwein C., van Deursen F.J. i wsp. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996; 24 (3): 489–493.
7. Zuckerman J.N., Zuckerman A.J. Mutations of the surface protein of hepatitis B virus. *Antiviral Research* 2003, 60: 75–78.
8. Baylis S.A., Shah N., Minor P.D. Evaluation of different assays for the detection of parvovirus B19 DNA in human plasma. *J. Virol. Methods* 2004; 121: 7–16.
9. Hokynar K., Norja P., Laitinen H. i wsp. Detection and differentiation of human parvovirus variants by commercial quantitative real-time PCR tests. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 2013–2019.
10. Cohen B.J., Gandhi J., Clewley J.P. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J. Clin. Virol.* 2006; 36: 152–155.
11. Koppelman M.H., Rood I.G., Fryer J.F., Baylis S.A., Cuypers H.T. Parvovirus B19 genotypes 1 and 2 detection with real-time polymerase chain reaction assays. *Vox Sang.* 2007; 93 (3): 208–215.
12. Baylis S.A., Buchheit K.H. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang.* 2009; 97 (1): 13–20.
13. Schmidt M., Korn K., Nübling C.M. i wsp. First transmission of human immunodeficiency virus Type 1 by a cellular blood product after mandatory nucleic acid screening in Germany. *Transfusion* 2009; 49 (9): 1836–1844.
14. Foglieni B., Candotti D., Guarnori I. i wsp. A cluster of human immunodeficiency virus Type 1 recombinant form escaping detection by commercial genomic amplification assays. *Transfusion* 2011, 51: 719–730.
15. World Health Organization (WHO): WHO Consultation on Global Measurement Standards and their use in the in vitro Biological Diagnostic Field. Geneva, Switzerland 7-8 June 2004: <http://www.who.int/bloodproducts/publications/en/Minutes-220804.pdf>
16. Brojer W., Gronowska A., Medyńska J. i wsp. The hepatitis C virus genotype and subtype frequency in hepatitis C virus RNA-positive, hepatitis C virus antibody-negative blood donors identified in the nucleic acid test screening program in Poland. *Transfusion* 2004; 44: 1706–1710.
17. Chlabicz S., Flisiak R., Kowalczyk O. i wsp. Changing genotype HCV distribution in Poland — relation to source and time of infection. *J. Clin. Virol.* 2008; 42: 156–159.
18. Chlabicz S., Flisiak R., Kowalczyk O. i wsp. High prevalence of genotype 4 among hepatitis C virus — infected intravenous drug users in north-eastern Poland. *J. Med. Virol.* 2008; 80 (4): 615–618.
19. Bielawski K.P., Dybikowska A., Lisowska-Charmuszko U. i wsp. Distribution of HBV genotypes and mutants among hepatitis B infected patients from northern Poland. *Int. J. Mol. Med.* 2004; 14 (2): 301–304.
20. Bielawski K.P., Charmuszko U., Dybikowska A., Stalke P., Podhajska A.J. Genetic variability of hepatitis B virus isolates in Poland. *Virus Genes* 2006; 33 (1): 77–86.
21. Ślusarczyk J., Białkowska J., Bucholc B. i wsp. [HBV genotypes among patients with chronic hepatitis B in the area of central Poland]. *Przegl. Epidemiol.* 2006; 60 (3): 555–561.
22. Dzierżanowska-Fangrat K., Woynarowski M., Szczygielska I. i wsp. Hepatitis B virus genotypes in children with chronic hepatitis B in Poland]. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006; 18 (6): 655–658.
23. Deterding K., Constantinescu I., Nedelcu F.D. i wsp. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J. Med. Virol.* 2008; 80 (10): 1707–1711.
24. Weber B. The diagnostic and clinical impact of the genetic variability of the S (surface) gene of hepatitis B virus. *J. Lab. Med.* 2004; 28 (1): 56–69.
25. Echevarria J.M., Avellon A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J. Med. Virol.* 2006; 78: S36–S42.
26. Okamoto H., Imai M., Kametani M., Nakamura T., Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn. Exp. Med.* 1987; 57: 231–236.
27. Osioy C., Giles E., Tanaka Y., Mizokami M., Minuk G.Y. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. *J. Virol.* 2006; 80: 10307–10314.
28. Simmonds P., Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis HBV virus genotype. *J. Virol.* 2005; 79 (24): 15467–15476.
29. Yang J., Xing K., Deng R., Wang J., Wang X. Identification of hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing. *J. Gen. Virol.* 2006; 87: 2203–2215.

30. Guirgis B.S.S., Abbas R.O., Azzazy H.E. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *Int. J. Infect. Diseases* 2010; 14: 941–953.
31. Colson P., Roquelaure B., Tamalet C. Detection of a newly identified hepatitis B virus genotype in southeastern France. *J. Clin. Virol.* 2009; 45 (2): 165–167.
32. Yu H., Yuan Q., Ge S.X. i wsp. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype „I”. *PLoS One* 2010; 5 (2): e9297.
33. Cavinta L., Sun J., May A. i wsp. A new isolate of hepatitis B virus from the Philippines possibly representing a new subgenotype C6. *J. Med. Virol.* 2009; 81 (6): 983–987.
34. Meldal B.H., Mould N.M., Barnes I.H.A., Boukef K., Allain J.-P. A novel hepatitis B virus subgenotype, D7, in Tunisian blood donors. *J. Gen. Virol.* 2009; 90: 1622–1628.
35. Hübschen J.M., Mbah P.O., Forbi J.C. i wsp. Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17 (1): 88–94.
36. Allain J.-P. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. *J. Clin. Virol.* 2006; 36 (supl. 1): S12–S17.
37. McMahon B.J. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol. Int.* 2009; 3 (2): 334–342.
38. Okamoto H., Tsuda F., Akahane Y. i wsp. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J. Virol.* 1994; 68: 8102–8110.
39. Carman W.F., Hadziyannis S., McGarvey M.J. i wsp. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588–591.
40. Buckwold V.E., Xu Z., Chen M., Yen T.S., Ou J.H. Effects of naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J. Virol.* 1996; 70: 5845–5851.
41. Günther S., Piwon N., Will H. Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1653) to T, A (1762) to T and G(1764) to A mutations in the core promoter. *J. Gen. Virol.* 1998; 79: 375–380.
42. Sterneck M., Kalinina T., Günther S. i wsp. Functional analysis of HBV genomes from patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1998; 28: 1390–1397.
43. Jammeh S., Tavner F., Watson R., Thomas H., Karayiannis P. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 901–909.
44. Purdy M.A., Talekar G., Swenson P., Araujo A., Fields H. A new algorithm for deduction of hepatitis B surface antigen subtype determinants from the amino acid sequence. *Intervirology* 2007; 50: 45–51.
45. Oon C.J., Chen W.N., Goo K.S., Goh K.T. Intra-familial evidence of horizontal transmission of hepatitis B virus surface antigen mutant G145R. *J. Infect.* 2000; 41: 260–264.
46. Bartolomeusz A., Locarnini S. Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *J. Med. Virol.* 2006; 78: S52–S55.
47. Kleinman S.H., Lelie N., Busch M.P. Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion. *Transfusion* 2009; 49: 2454–2489.
48. Fattovich G., Bartolotti F., Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J. Hepatol.* 2008; 48: 335–352.
49. Kao J.-H. Role of viral factors in the natural course and therapy of chronic hepatitis B. *Hepatol. Int.* 2007; 1: 415–430.
50. Brechot C., Thiers V., Kremsdorf D., Nalpas B., Pol S., Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus: clinical significant or purely occult? *Hepatology* 2001; 34: 194–203.
51. Allain J.-P. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang.* 2004; 86: 83–91.
52. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral. Hepat.* 2004; 11 (2): 97–107.
53. Magdzik W. Hepatitis B epidemiology in Poland, Central and Eastern Europe and the newly independent states. *Vaccine* 2000; 18 (supl 1): S13–S16.
54. Grabarczyk P., Seyfried H., Brojer E. i wsp. HBsAg detection in blood donors in Poland, 1995–2004. *J. Transf. Med.* 2009; 2 (1): 20–25.
55. Kuśmierczyk J., Zatorska J., Ras J. i wsp. Prevalence of anti-HBc antibodies in blood donors in the South region of Poland. *Vox Sang.* 2006; 9, (supl 3): 56.
56. Windyga J., Grabarczyk P., Stefańska E i wsp. [Prevalence of HCV, HBV and HIV infections among severe Polish haemophiliacs]. *Przegl. Epidemiol.* 2008, 62: 415–423.
57. Grzegorzewska A.E., Kurzawska-Firlej D., Świdzki A. i wsp. [Infections with hepatitis B virus in hemodialysis unit of Wielkopolska]. *Przegl. Epidemiol.* 2008; 2 (91): 29–37
58. Brojer E., Grabarczyk P., Liszewski G. i wsp. Characterization of HBV DNA positive/HBsAg negative blood donors in Poland identified by triplex NAT. *Hepatology* 2006; 44: 1666–1674.
59. Candotti D., Grabarczyk P., Ghiazza P. i wsp. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or genotype D strains. *J. Hepatol.* 2008; 49: 537–547.
60. Stepien M., Czarkowski M.P. [Hepatitis B in Poland in 2008]. *Przegl. Epidemiol.* 2010; 64 (2): 239–244.
61. C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball (Editors). *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2005, Elsevier Academic Press.
62. Kerr J.R., Cotmore S.F., Bloom M.E., Linden M.R., Parrish C.R. (red.). *Parvoviruses*. Hodder Arnold, Great Britain 2006.
63. Heegaard E.D., Brown K.E. Human parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (3): 485–505.
64. Young N.S., Brown K.E. Mechanisms of disease. *Parvovirus B19*. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350 (6): 586–596.
65. Nguyen Q.T., Sifer C., Schneider V. i wsp. Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 2483–2487.
66. Nguyen Q.T., Wong S., Heegaard E.D., Brown K.E. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology* 2002; 301 (2): 374–380.
67. Servant A., Laperche S., Lallemand F. i wsp. Genetic diversity within human erythroviruses: Identification of three genotypes. *J. Virol.* 2002; 76: 9124–9134.
68. Toan N.L., Duechting A., Kremsner P.G. i wsp. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. *J. Gen. Virol.* 2006; 87: 2941–2949.
69. Parsyan A., Szmargd C., Allain J.P., Candotti D. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 428–431.
70. Corcoran C., Hardie D., Yeats J., Smuts H. Genetic variants of human parvovirus B19 in South Africa: co-circulation of three

- genotypes and identification of a novel subtype of genotype 1. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 137–142.
71. Blümel J., Eis-Hübinger A.M., Stuhler A. i wsp. Characterization of parvovirus B19 genotype 2 in KU812Ep6 cells. *J. Virol.* 2005; 79: 14197–14206.
 72. Ekman A., Hokynar K., Kakkola L. i wsp. Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J. Virol.* 2007; 81, 13: 6927–6935.
 73. Chen Z., Guan W., Cheng F., Chen A.Y., Qiu J. Molecular characterization of human parvovirus B19 genotypes 2 and 3. *Virology* 2009; 394: 276–285.
 74. Baylis S.A., Fryer J.F., Grabarczyk P. Effects of probe binding mutations in an assay designed to detect parvovirus B19: Implications for the quantitation of different virus genotypes. *J. Virol. Methods* 2007; 139: 97–99.
 75. Aberham C., Pendl C., Gross P., Zerlauth G., Gessner M. A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Methods* 2001; 92: 183–191.
 76. de Jong E.P., de Haan T.R., Kroes A.C.M. i wsp. Parvovirus B19 infection in pregnancy. *J. Clin. Virol.* 2006; 36:1–7.
 77. Corcoran A., Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host — pathogen interactions of parvovirus B19. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53: 459–475.
 78. Parsyan A., Candotti D. Human erythrovirus B19 and blood transfusion — an update. *Transf. Med.* 2007; 17 (4): 263–278.
 79. Yee T.T., Cohen B.J., Pasi K.J., Lee C.A. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by clotting factor concentrate. *Br. J. Haematology* 1996; 93: 457–459.
 80. Santagostino E., Mannucci P.M., Gringeri A. i wsp. Transmission of parvovirus B19 by coagulation factor concentrates exposed to 100° C heat after lyophilization. *Transfusion* 1997; 37: 517–522.
 81. Blümel J., Schmidt I., Effenberger W. i wsp. Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting concentrates. *Transfusion* 2002; 42: 1473–1481.
 82. Yu M.-Y. W., Alter H.J., Virata-Theimer M.L.A. i wsp. Parvovirus B19 infection transmitted by transfusion of red blood cells confirmed by molecular analysis of linked donor and recipient samples. *Transfusion* 2010; 50 (8): 1712–1721.
 83. Cohen B.J., Beard S., Knowles W.A. i wsp. Chronic anemia due to parvovirus B19 infection in a bone marrow transplant patient after platelet transfusion. *Transfusion* 1997, 37: 947–952.
 84. Satake M., Hoshi Y., Taira R. i wsp. Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood component transfusion. *Transfusion* 2011 [in press].
 85. Persyan A., Addo-Yobo E., Owuso-Ofori A. i wsp. Effects of transfusion on human erythrovirus B19-susceptible or infected pediatric recipients in a genotype 3-endemic area. *Transfusion* 2006; 46: 1593–1600.
 86. Wąsak-Szulkowska E., Grabarczyk P., Rzepecki P. Pure red cell aplasia due to parvovirus B19 infection transmitted probably through hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 2008, 10: 201–205.
 87. Yango A. Jr, Morrissey P., Gohh R., Wahbeh A. Donor-transmitted parvovirus infection in a kidney transplant recipient presenting as pancytopenia and allograft dysfunction. *Transpl. Infect. Dis.* 2002; 4: 163–166.
 88. Siennicka J., Stefanoff P., Trzcńska A., Rosińska M., Litwińska B. [Seroprevalence study of parvovirus B19 in Poland]. *Przegl. Epidemiol.* 2006; 60 (3): 571–580.
 89. Mossong J., Hens N., Friederichs V. i wsp. Parvovirus B19 infection in five European countries: seroepidemiology, force of infection and maternal risk of infection. *Epidemiol. Infect.* 2008; 136: 1059–1068.
 90. Brojer E., Grabarczyk P., Łopaciuk S., Moraczewska Z., Żupańska B. Prevalence of human parvovirus B19 DNA and IgG/IgM antibodies in Polish haemophilia patients. *Vox Sang.* 1999; 77: 107.
 91. Oszukowski P., Małafiej E., Pertyński T. i wsp. [Infection with parvovirus B19 in pregnant women]. *Ginekol. Pol.* 1996; 67 (3): 114–116.
 92. Lenkiewicz B., Roszkowski T., Grabarczyk P. i wsp. [Diagnosis of human parvovirus B19 infection in nonimmune hydrops fetalis]. *Gin. Pol.* 1998; 69 (4): 175–181.
 93. Zahn A., Li Ch., Danso K. i wsp. Molecular characterization of occult hepatitis B virus genotype E-infected subjects. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 409–418.
 94. Candotti D., Opere-Sem O., Rezvan H., Sarkodie F., Allain J.-P. Molecular and serological characterization of hepatitis B virus in deferred Ghanaian blood donors with and without elevated alanine aminotransferase. *J. Viral. Hep.* 2006; 13: 715–724.
 95. Ozaslan M., Ozaslan E., Barsgan A., Koruk M. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Turkish patients. *J. Genetics* 2007; 86 (3): 195–201.
 96. Rozanov M., Plikat U., Chappey C., Kochergin A., Tatusova T. A web-based genotyping resource for viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: W654–W659.
 97. Kwok S., Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237–238.
 98. Candotti D., Etiz N., Parsyan A., Allain J.-P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol.* 2004; 78 (22): 12169–12178.
 99. Chenna R., Sugawara H., Koike T. i wsp. Multiple sequence alignment with the CLUSTAL series of programs. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3497–3500.
 100. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evolut.* 2007; 24: 1596–1599.
 101. Shade R.O., Blundell M.C., Cotmore S.F., Tattersall P., Astell C.R. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J. Virol.* 1986; 58: 921–936.
 102. Hokynar K., Söderlund-Venermo M., Pesonen M. i wsp. A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology* 2002; 302: 224–228.
 103. van Roosmalen MH, de Jong JJ, Haenen W i wsp. A new HBsAg screening assay designed for sensitive detection of HBsAg subtypes and variants. *Intervirology* 2006; 49 (3): 127–132.
 104. La'ulu S.L., Roberts W.L. The analytic sensitivity and mutant detection capability of six hepatitis B surface antigen assays. *Immunopathology* 2006; 125: 748–751.
 105. Scheiblauer H., Soboll H., Nick S. Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. *J. Med. Virol.* 2006, 78: S66–S70.
 106. Sanchez L.V., Tanaka Y., Maldonado M., Mizokami M., Panduro A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of Mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. *Intervirology* 2007; 50 (1): 9–15.
 107. Křekulova L., Rehak V., da Silva Filho H.P., Zavoral M., Riley L.W. Genotypic distribution of hepatitis B virus in the Czech Republic: a possible association with modes of transmission and clinical outcome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 15: 1183–1188.

108. Olinger C.M., Lazouskaya N.V., Eremin V.F., Muller C.P. Multiple genotypes and subtypes of hepatitis B and C viruses in Belarus: similarities with Russia and western European influence. *Clin. Microbiol. and Infect.* 2008; 6: 575–581.
109. Tallo T., Tefanova V., Priimagi L. i wsp. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 1829–1839.
110. Norder H., Couroucé A.M., Coursaget P. i wsp. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289–309.
111. Allain J.P., Belkhir D., Vermeulen M. i wsp. Characterization of occult hepatitis B virus strains in South African blood donors. *Hepatology.* 2009; 49 (6): 1868–1876.
112. Zheng X., Ye X., Zhang L. i wsp. Characterization of occult hepatitis B virus infection from blood donors in China. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49:1730–1737.
113. Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B.H., Magnius L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.* 2002; 83: 2059–2073.
114. Alvarado-Esquivel C., Sablon E., Conde-Gonzalez C.J. i wsp. Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: predominant circulation of hepatitis B virus genotype H. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12: 6540–6545.
115. Echevarría J.M., Avellón A., Magnius L.O. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J. Med. Virol.* 2005; 76: 176–184.
116. Davidson F., Lycett C., Sablon E., Petrik J., Dow B.C. Hepatitis B virus genotypes and precore mutations in Scottish blood donors. *Vox Sang.* 2005; 88: 87–92.
117. Sloan R.D., Strang A.L., Ramsay M.E., Teo C.G. Genotyping of acute HBV isolates from England, 1997–2001. *J. Clin. Virol.* 2009; 44 (2): 157–160.
118. Ohnuma H., Yoshikawa A., Mizoguchi H., Okamoto H., and JRC NAT Screening Research Group. Characterization of genotype H hepatitis B virus strain identified for the first time from a Japanese blood donor by nucleic acid amplification test. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 595–599.
119. Chihara N., Arase Y., Suzuki F. i wsp. Prolonged hepatitis after acute infection with genotype H hepatitis B virus. *Intern. Med.* 2007; 46: 1847–1851.
120. Nakajima A., Usui M., Huy T.T.T. i wsp. Full-length sequence of hepatitis B virus belonging to genotype H identified in a Japanese patient with chronic hepatitis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2005; 58: 244–246.
121. Kuhns M.C., Kleinman S.H., McNamara A.L. i wsp. Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. *Transfusion* 2004; 44: 1332–1339.
122. Allain J.-P., Sarkodie F., Candotti D., Opere-Sem O. Lack of correlation between hepatitis B surface antigen and hepatitis B virus DNA levels in blood donors. *Transfusion* 2005; 45: 1039–1040.
123. Gerlich W.H., Glebe D., Schusttler C.G. Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. *J. Viral. Hepat.* 2007; 14 (supl. 1): 16–21.
124. Koppelman M.H.G.M., Sjerps M.C., Reesink H.W., Cuypers H.T.M. Evaluation of COBAS AmpliPrep nucleic acid extraction in conjunction with COBAS AmpliScreen HBV DNA, HCV RNA and HIV-1 RNA amplification and detection. *Vox Sang.* 2005; 89: 193–200.
125. Biswas R., Tabor E., Hsia C.C. i wsp. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003; 43: 788–798.
126. Deguchi M., Yamashita N., Kagita M. i wsp. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. *J. Virol. Methods* 2004; 115: 217–222.
127. Ozaras R., Tabak F., Tahan V. i wsp. Correlation of quantitative assay of HBsAg and HBV DNA levels during chronic HBV treatment. *Dig. Dis. Sci.* 2008; 53: 2995–2998.
128. Kohmoto M., Enomoto M., Tamori A. i wsp. Quantitative detection of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. *J. Med. Virol.* 2005; 75 (2): 235–239.
129. Jaroszewicz J., Calle Serrano B., Wursthorn K., i wsp. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J. Hepatol.* 2010; 52 (4): 514–522.
130. Coleman P.F. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. *Emerg. Infect. Diseases.* 2006; 12(2): 198–203.
131. Coleman P.F., Jack Chen Y.C., Mushahwar I.K. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. *J. Med. Virol.* 1999; 59: 19–24.
132. Lu T.D. Detection HBsAg mutants by immunoassays. *J. Med. Virol.* 2007; 79: S37–S41.
133. Magdził W., Czarkowski M.P. [Coverage of vaccination against hepatitis B in Poland in 2004]. *Przegl. Epidemiol.* 2006; 60 (2): 185–192.
134. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P. i wsp. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 11: 325–329.
135. Lada O., Benhamou Y., Poynard T., Thibault V. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of “a” determinant variants. *J. Virol.* 2006; 80: 2968–2975.
136. Margeridon S., Lachaux A., Trepo C., Zoulim F., Kay A. A quasi-monoclonal anti-HBs response can lead to immune escape of “wild-type” hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 1687–1693.
137. Kao J.-H., Chen P.-J., Lai M.-Y., Chen D.-S. Clinical and virological aspects of blood donors infected with hepatitis B virus genotypes B and C. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 22–25.
138. Liefeldt L., Plentz A., Klempa B. i wsp. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analysed by real-time PCR for simultaneous detection of genotype 1 to 3. *J. Med. Virol.* 2005; 75: 161–69.
139. Hübschen J.M., Mihneva Z., Mentis Z. i wsp. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 3735–3738.
140. Ermolovich M.A., Semeiko G.V., Samoilovich E.O., Hübschen J.M., Muller C.P. Molecular epidemiology of parvovirus infection in Belarus. *Vopr. Virusol.* 2010; 55 (2): 26–31.
141. Amiot L., Langanay T., Drenou B. i wsp. Spontaneous recovery from severe parvovirus B19 pure red cell aplasia, in a heart transplant recipient, as demonstrated by marrow culture. *Hematol. Cell Ther.* 1998; 40: 71–73.
142. Tang J.W., Lau J.S., Wong S.Y. i wsp. Dose-by-dose virological and hematological responses to intravenous immunoglobulin in

- an immunocompromised patient with persistent parvovirus B19 infection. *J. Med. Virol.* 2007; 79: 1401–1405.
143. Oeda E., Shinohara K., Inoue H., Nomiyama J. Parvovirus B19 infection causing severe peripheral blood thrombocytopenia and persistent viremia. *Am. J. Hematol.* 1994; 45: 274–275.
 144. Schneider B., Becker M., Brackmann H.-H., Eis-Hübinger A.M. Contamination of coagulation factor concentrates with human parvovirus B19 genotype 1 and 2. *Thromb. Haemost.* 2004; 92: 838–845.
 145. Corcioli F., Zakrzewska K., Rinieri A. i wsp. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J. Med. Virol.* 2008; 80: 2005–2011.
 146. Schneider B., Höne A., Tolba R.H. i wsp. Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 164–176.
 147. Wong S., Young N.S., Brown K.E. Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia. *J. Infect. Dis.* 2003; 15: 1581–1586.
 148. Sanabani S., Neto W.K., Pereira J., Sabino E.C. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 604–606.
 149. Norja P., Hokynar K., Aaltonen L.-M. i wsp. Bioportfolio: life-long persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *PNAS* 2006; 103: 7450–7453.
 150. Norja P., Eis-Hübinger M., Söderlund-Venermo M., Hedman K., Simmonds P. Rapid sequence change and geographical spread of human parvovirus B19: comparison of B19 virus evolution in acute and persistent infection. *J. Virol.* 2008; 82: 6427–6433.
 151. Dobec M., Juchler A., Flaviano A., Kaeppli F. Prolonged parvovirus B19 viremia in spite of neutralizing antibodies after erythema infectiosum in pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2007; 63: 53–54.
 152. Lefrère J.J., Servant-Delmas A., Candotti D. i wsp. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood* 2005, 106 (8): 2890–2895.
 153. Matsukura H., Shibata S., Tani Y., Shibata H., Furuta R.A. Persistent infection by human parvovirus B19 in qualified blood donors. *Transfusion* 2008; 48: 1036–1037.
 154. Schmidt M., Themann A., Drexler C. i wsp. Blood donor screening for parvovirus B19 in Germany and Austria. *Transfusion* 2007; 47: 1775–1782.
 155. Kurtzman G.J., Cohen B.J., Field A.M. i wsp. Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 1114–1123.
 156. Isa A., Norbeck O., Hirbod T. i wsp. Aberrant cellular immune responses in humans infected persistently with parvovirus B19. *J. Med. Virol.* 2006; 78: 129–133.
 157. Erdman D.D., Durigon E.L., Wang Q.-Y., Anderson L.J. Genetic diversity of human parvovirus B19: sequence analysis of the VP1/VP2 gene from multiple isolates. *J. Gen. Virol.* 1996; 77: 2767–2774.
 158. Hemauer A., Poblitzki A., Gigler A. i wsp. Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *J. Gen. Virol.* 1996; 77: 1781–1785.
 159. Parsyan A., Kerr S., Owusu-Ofori S. Elliott G., Allain J.P. Reactivity of genotype-specific recombinant proteins of human erythrovirus B19 with plasmas from areas where genotype 1 or 3 is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 (4): 1367–75.
 160. Hsu H., Chang M., Nu Y.H., Wang S.M., Chen D.S. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute and chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 1997; 26: 786–791.