

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Οι γονότυποι του ιού ηπατίτιδας Β (HBV) Από την επιδημιολογία στην κλινική πράξη

Ο ιός της ηπατίτιδας Β συνιστά έναν από τους πλέον διαδεδομένους παθογόνους μικροοργανισμούς που μολύνουν τον άνθρωπο, προκαλώντας οξεία ή χρόνια λοίμωξη του ήπατος. Η μοναδικότητα του ιού οφείλεται στο γονιδίωμά του, το οποίο είναι μερικώς δίκλωνο κυκλικό DNA και στο γεγονός ότι ο κύκλος ζωής του ιού περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο στάδιο αντίστροφης μεταγραφής, που καταλύεται ενζυμικά από την αντίστροφη μεταγραφή του ιού. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος αλλά και της ικανότητάς του για ανασυνδυασμό, ο ιός παρουσιάζει μεγάλη γενετική ετερογένεια. Η παγκόσμια κατανομή των γονοτύπων του HBV, όπως περιγράφεται από τη μοριακή επιδημιολογία, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού εμφανίζει συγκεκριμένο γεωγραφικό πρότυπο, το οποίο πιθανότατα να σχετίζεται είτε με τον τρόπο μετάδοσης του ιού, αλλά κυρίως με την προέλευση και την εξελικτική του ιστορία. Όσον αφορά στα σενάρια προέλευσης της ζωονόσου θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο HBV έχει απομονωθεί από άλλα ανώτερα πρωτεύοντα εκτός του ανθρώπου, αλλά όχι από τους πιθήκους του παλαιού κόσμου. Αναφορικά με τη σχέση γονότυπου-φαινότυπου, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στις συχνότητες εμφάνισης μεταλλάξεων που συνδέονται με σημαντικές βιολογικές ιδιότητες του ιού, όπως οι προπυρηνικές μεταλλάξεις και οι μεταλλάξεις στο βασικό υποκινητή του γονιδίου της πυρηνικής πρωτεΐνης. Επιπλέον, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι ο ανασυνδυασμός επηρεάζει τις βιολογικές ιδιότητες του HBV, αφού τα ανασυνδυασμένα στελέχη παρουσιάζουν ιδιότητες που αποτελούν συνδυασμό των ιδιοτήτων των προγονικών στελεχών. Οι γονότυποι του HBV, εκτός από διαφορές σε επίπεδο γονιδιώματος, φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά και ως προς τις βιολογικές ιδιότητες. Τέλος, σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι διαδραματίζουν οι γονότυποι στην παθογένεια της νόσου καθώς και στην ανταπόκριση στα διάφορα θεραπευτικά σχήματα και, πιο συγκεκριμένα, διαφορές έχουν εντοπιστεί στην εξέλιξη προς ηπατική κίρρωση, προς ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και στην ανταπόκριση σε θεραπεία με ιντερφερόνη.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οικογένεια των *Hepadnaviridae*

Ο HBV (human hepatitis B virus ή hepatitis B virus) είναι ένας ιός δίκλωνου DNA με περίβλημα (envelope) οικογένειας *Hepadnaviridae*.¹ Η οικογένεια των *Hepadnaviridae* υπάγεται στην ομάδα των *Retroids*, στους οποίους υπάγονται ιοί με στάδιο αντίστροφης μεταγραφής στον κύκλο ζωής τους. Η οικογένεια των *Hepadnaviridae* χωρίζεται σε δύο γένη: το γένος *Orthohepadnavirus*, στο οποίο περιλαμβάνονται όλοι οι ιοί που

μολύνουν θηλαστικά, και το γένος *Avihepadnavirus*, στο οποίο περιλαμβάνονται οι ιοί που μολύνουν πτηνά. Η οικογένεια αυτών των ιών έχει μέλη ηπατοτρόπους ιούς με γενετικό υλικό μερικώς δίκλωνο DNA.

Η οικογένεια των *Hepadnaviruses* χωρίζεται σε δύο γένη: στο γένος *Orthohepadnavirus* και στο γένος *Avihepadnavirus*. Σε κάθε γένος έχουν απομονωθεί ιοί από ένα μεγάλο εύρος ξενιστών (πίν. 1). Στο γένος *Orthohepadnavirus*, εκτός από τον ιό που μολύνει τον άνθρωπο, υπάγονται ιοί που μολύνουν άλλα πρωτεύοντα και θηλαστικά. Ο ιός της ηπατίτιδας Β των δασύτρικων πι-

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2007, 24(6):542-556
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2007, 24(6):542-556

Ε. Μαγιορκίνης,
Γ. Μαγιορκίνης,
Α. Χατζάκης

Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Αθήνα

Hepatitis B virus (HBV) genotypes:
from epidemiology to clinical
practice

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηριασμού

Ανασυνδυασμός
Γονότυποι
Ιός ηπατίτιδας Β
Μοριακή επιδημιολογία
Ορότυποι

Υποβλήθηκε 20.4.2006
Εγκρίθηκε 7.7.2006

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των διαφόρων ιών της οικογένειας των *Hepadnaviruses*.

Γένος	Ιός	Ξενιστής	Αναφορές
<i>Orthohepadnavirus</i>	HBV	Άνθρωπος	1
	ChHBV [#]	Χιμπατζής	2
	GoHBV ^{**}	Γορίλας	3
	OuHBV [#]	Ουρακοτάγκος	4,5
	GiHBV [#]	Γίβωνας	6
	WMHBV	Δασύτριχοι πίθηκοι	7
	WHV	Μαρμότα	8,9
	GSHV	Σκίουροι	10
	ASHV	Αρκτικός σκίουρος	11
	<i>Avihepadnavirus</i>	DHBV	Πάπια
HHBV		Γκρίζος ερωδιός	14
HBV ⁺		Πελαργός	15
CCHBV		Γερανός	16
HBV ⁺		Είδη χηνών	17,18

[#]Οι ιοί που μολύνουν τα διάφορα πρωτεύοντα (εκτός από τον άνθρωπο) εμφανίζουν υψηλή γενετική ομοιότητα με τον ιό που μολύνει τον άνθρωπο

^{*} Ο ιός που μολύνει το γορίλα παρουσιάζει μεγάλη γενετική ομοιότητα με αυτόν που μολύνει τους χιμπατζήδες, ομαδοποιείται φυλογενετικά με την ομάδα του ChHBV και για τους περισσότερους συγγραφείς δεν θεωρείται ξεχωριστός ιός

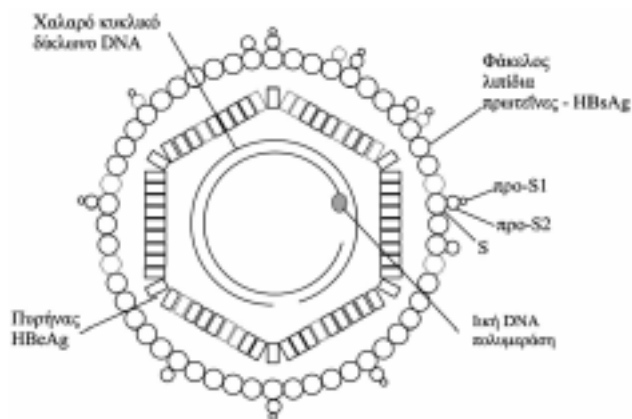
⁺ Για τους ιούς αυτούς δεν έχει προταθεί διαφορετική ονοματολογία στη διεθνή βιβλιογραφία

θήκων (*woolly monkey hepatitis B virus*, WMHBV) αποτελεί τον πλέον ετερογενή γενετικά ιό που έχει απομονωθεί από πρωτεύοντα. Ο ιός που προσβάλλει τις μαρμότες παρουσιάζει ομοιότητα 70% στη νουκλεοτιδική αλληλουχία, ενώ οι ιοί που μολύνουν τρωκτικά του γένους *Spermophilus* παρουσιάζουν ομοιότητα 82% με τον WHV^{11,12}

Στο γένος *Avihepadnavirus*, ο ιός που μολύνει τις πάπιες του Πεκίνου (DHBV) παρουσιάζει ομοιότητα μόλις 40% σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τον HBV.⁸ Το εύρος των ξενιστών των ιών του γένους αυτού είναι περιορισμένο. Ο DHBV, για παράδειγμα, μπορεί να μολύνει τις χήνες, ενώ ο GSHV μπορεί να μολύνει τις μαρμότες, αλλά ο HHBV δεν μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη σε νεογέννητες πάπιες.¹⁴

1.2. Μορφολογία του ιού

Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε ορούς πασχόντων με υψηλές τιμές ιικού φορτίου έδειξαν ότι, μορφολογικά, ο ιός διακρίνεται σε τρεις τύπους όσον αφορά στη δομή του ιοσωματίου. Το τυπικό ιοσωμάτιο του HBV (Dane particle) (εικ. 1) έχει διάμετρο 42 nm και αποτελείται από (α) το εξωτερικό περίβλημα πάχους 14



Εικόνα 1. Δομή του ιού της ηπατίτιδας Β (σωμάτιο Dane).

nm, που αποτελείται από το αντιγόνο επιφανείας του ιού (HBsAg) και (β) το πυρηνοκαψίδιο διαμέτρου 28 nm (nucleocapsid) εσωτερικά του περιβλήματος, το οποίο αποτελείται από το πυρηνικό αντιγόνο (HBeAg). Το πυρηνοκαψίδιο εσωκλείει το γενετικό υλικό και την πολυμεράση του ιού. Άλλοι τύποι ιοσωματίων του ιού, τα οποία δεν είναι μολυσματικά, είναι τα σφαιρίδια (spherical particles) διαμέτρου 17–25 nm, που απαντώνται στον ορό ασθενών σε συγκέντρωση μέχρι και 10^{13} /mL, και σε μικρότερο αριθμό οι σωληνίσκοι (tubular structures or filaments) διαμέτρου 20–22 nm, ποικίλου μήκους, που ανιχνεύονται σε συγκέντρωση έως 10^{11} /mL.

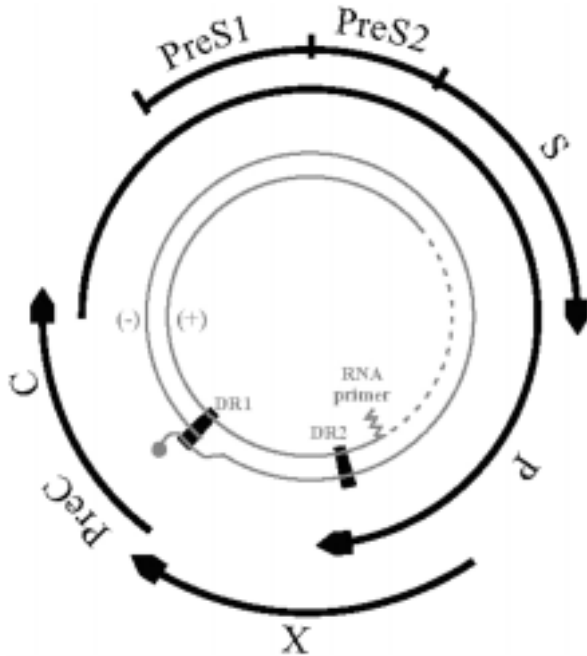
1.3. Το γονιδίωμα του HBV

Το γονιδίωμα του HBV (εικ. 2) είναι χαλαρό κυκλικό μόριο DNA (relaxed circular DNA) και μερικώς δίκλωνο, με μήκος 3182–3221 βάσεις ανάλογα με το γονότυπο του ιού. Οι δύο αλυσίδες του DNA συγκατοούνται σε κυκλική διαμόρφωση με δεσμούς υδρογόνου λόγω αλληλοεπικάλυψης 226 βάσεων μεταξύ των 5' άκρων των δύο αλυσίδων που περιέχουν δύο ευθείες επαναλήψεις 11 νουκλεοτιδίων, οι οποίες ονομάζονται DR1 και DR2 (directed repeat).¹

Το μικρό μήκος του γονιδιώματος του ιού έχει ως συνέπεια να παράγεται περιορισμένος αριθμός πρωτεϊνών από τέσσερα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, τα οποία μερικώς αλληλοεπικαλύπτονται. Αυτές, πολύ περιληπτικά, είναι οι ακόλουθες:

- *Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της προεπιφανειακής-επιφανειακής πρωτεΐνης (Pre-S/S)*

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης Pre-S/S, μήκους 1169–1202 νουκλεοτιδίων, κωδικοποιεί τη μικρή, τη μεσαία και τη μεγάλη πρωτεΐνη επιφανείας (SHBs με 226 αμινοξέα μοριακού βάρους 24 kDA, MHBs



Εικόνα 2. Το γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας Β.

με 281 αμινοξέα μοριακού βάρους 33–36 kDa, LHBS με 389–400 αμινοξέα μοριακού βάρους 39–42 kDa). Και οι τρεις επιφανειακές πρωτεΐνες αποτελούν συστατικά των μολυσματικών ισωματίων διαμέτρου 42 nm. Η μικρή επιφανειακή πρωτεΐνη αναφέρεται επίσης ιστορικά και ως αυστραλιανό αντιγόνο (Australia antigen, Au antigen).

– *Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης προπυρηνικής-πυρηνικής πρωτεΐνης (pre-C/C)*

Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης pre-C/C, μήκους 638–645 νουκλεοτιδίων, κωδικοποιεί δύο πρωτεΐνες: (α) Την πυρηνική πρωτεΐνη μήκους 183–195 αμινοξέων και μοριακού βάρους 21 kDa, η οποία είναι το κύριο πολυπεπίδιο του νουκλεοκαψιδίου και εκφράζει το πυρηνικό αντιγόνο (HBcAg). (β) Την προπυρηνική πρωτεΐνη μήκους 212 αμινοξέων και μοριακού βάρους 18 kDa, συνολικά, η οποία υφίσταται ωρίμανση και παράγεται το διαλυτό πρώιμο αντιγόνο (early antigen, HBeAg) του ιού.¹ Το αντιγόνο HBeAg θεωρείται βοηθητική πρωτεΐνη του ιού. Το πρώιμο αντιγόνο είναι σημαντικό για την εδραίωση χρόνιας λοίμωξης.

– *Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της πολυμεράσης (polymerase, pol)*

Το προϊόν του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της πολυμεράσης, μήκους 1169–1202 νουκλεοτιδίων, είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη μήκους 834–845 αμινοξέων, με μοριακό βάρος 90 kDa, με τέσσερις

τουλάχιστον περιοχές¹⁹ (domains) και αντίστοιχες ενεργότητες (activities). Η αμινική επικράτεια, γνωστή ως τελική πρωτεΐνη (terminal protein), συνδέεται ομοιοπολικά με το 5' άκρο της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας του ιικού DNA. Αυτό το τμήμα της πρωτεΐνης είναι απαραίτητο για την έναρξη της σύνθεσης της αρνητικής αλυσίδας του ιικού DNA. Μια παρεμβαλλόμενη περιοχή, η οποία δεν φαίνεται να έχει κάποια συγκεκριμένη λειτουργία, αναφέρεται ως συνδετική περιοχή (spacer region). Η τρίτη επικράτεια κωδικοποιεί μια RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, δηλαδή μια αντίστροφη μεταγραφάση. Η καρβοξυλική επικράτεια κωδικοποιεί μια ριβονουκλεάση H (RNaseH), η οποία αποικοδομεί το RNA σε υβρίδια RNA-DNA κατά την αντίστροφη μεταγραφή (εικ. 3).

– *Ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης πρωτεΐνης X*

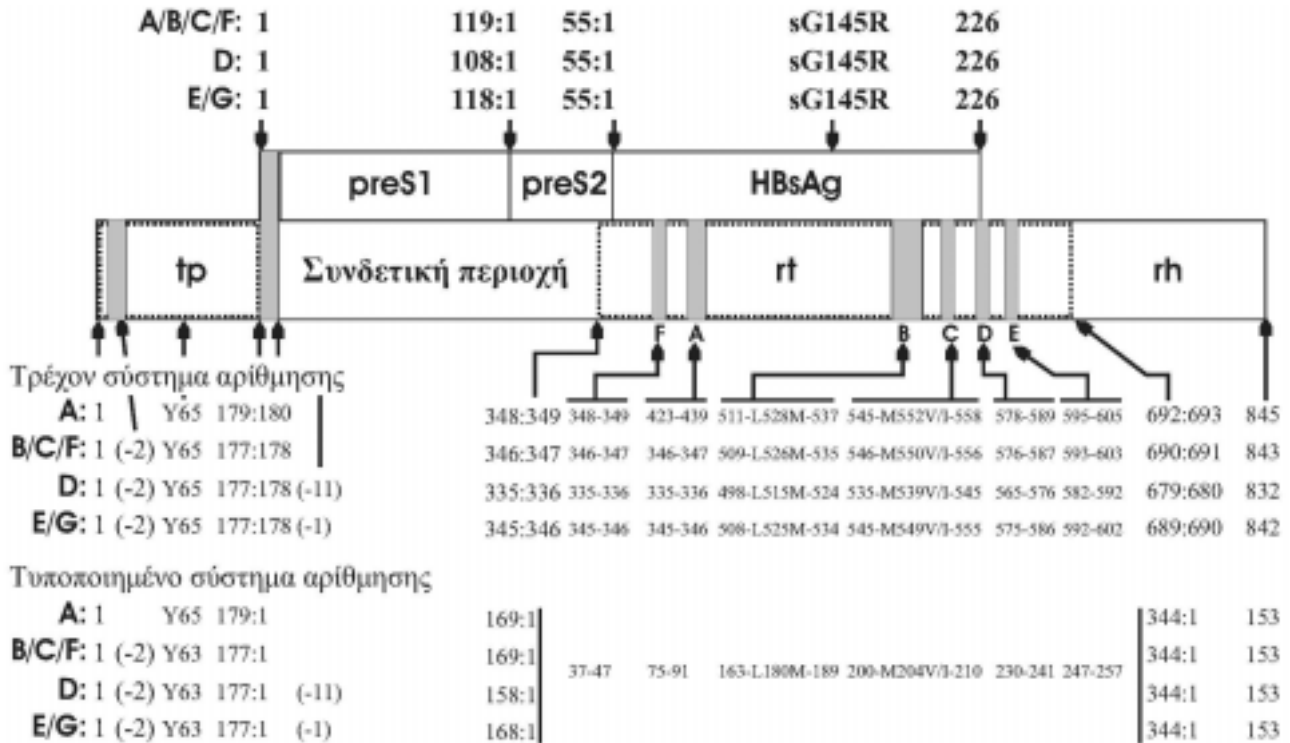
Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης X, μήκους 464–470 νουκλεοτιδίων, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 154 αμινοξέων (HBx) με μοριακό βάρος 17 kDa. Ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής δεν είναι σαφώς εξακριβωμένος, καθώς έχει σχετιστεί με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του ιού²⁰ αλλά και με την καρκινογένεση.²¹

Πολλάπλά, επίσης, ρυθμιστικά στοιχεία βρίσκονται διάσπαρτα σε ολόκληρο το ιικό γονιδίωμα και εμπλέκονται στη ρύθμιση και την έκφραση κάθε ιικού γονιδίου. Επειδή κάθε περιοχή του γονιδιώματος του HBV είναι αλληλουχία που κωδικοποιεί πρωτεΐνη, όλα τα στοιχεία που δρουν *in cis* εντοπίζονται μέσα σε αλληλουχίες γονιδίων. Αυτή η γενετική διεύθυνση είναι σπάνια στην Ιολογία, καθώς είναι γνωστό ότι συνήθως τα *cis* δρώντα στοιχεία εντοπίζονται σε περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Η γονιδιακή έκφραση του HBV ρυθμίζεται από δύο ενισχυτές (enhancers) (EnH1, EnH2), τέσσερις υποκινητές (promoters) (pre-S1, pre-S2, core, X), ένα στοιχείο απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GRE), ένα αρνητικό ρυθμιστικό στοιχείο (NRE) και ένα στοιχείο CCAAT. Τρία ρυθμιστικά στοιχεία στο ιικό RNA, το σήμα πολυαδενυλίωσης, το μετα-μεταγραφικό ρυθμιστικό στοιχείο (Post-transcriptional Regulatory Element, PRE) και το σήμα εγκαψιδίωσης (encapsidation signal, ε), επίσης ελέγχουν την αντιγραφή του ιού.²²

2. ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΙΟΥ

2.1. Ιστορικά στοιχεία

Η πρώτη αναφορά σχετικά με την ποικιλομορφία του HBV προήλθε από τον Le Bouvier,²³ ο οποίος περιέγραψε δύο καθοριστές υποτύπων, τους *d* και *y*. Αυτοί οι



Εικόνα 3. Γενετική οργάνωση του γονιδίου της πολυμεράσης¹⁹ και η αρίθμηση με το τυποποιημένο και το παλαιότερο σύστημα αρίθμησης για τους διάφορους γονότυπους.

καθοριστές βρίσκονται στην επιφανειακή πρωτεΐνη κοντά στον κύριο αντιγονικό καθοριστή a.²⁴ Δύο επιπλέον καθοριστές, w και r, περιγράφηκαν από τους Bancroft et al,²⁵ οι οποίοι βρήκαν ότι κάθε στέλεχος του HBV μπορεί να χαρακτηριστεί ανάλογα με το συνδυασμό καθοριστών που έχει ως adw, adr, ayw ή ayr. Σε μια μεγάλη μελέτη, επιπλέον ορότυποι χαρακτηρίστηκαν από την ομάδα των Courouce-Party et al.²⁶ Έχουν περιγραφεί εννιά ορότυποι: ayw 1-4, ayr, adw2, adw4, adrq- και adrq+, για τους οποίους προτάθηκε ένα γεωγραφικό πρότυπο όσον αφορά στην παγκόσμια κατανομή τους.

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 έγινε σαφές ότι οι καθοριστές οροτύπων προσδιορίζονται από αμινοξέα, στη θέση 122 (d ή y) και στη θέση 160 (r ή w) στη βασική επιφανειακή πρωτεΐνη, αντίστοιχα.^{27,28} Οι καθοριστές οροτύπων d και w έχουν λυσίνη και στις δύο θέσεις, ενώ όταν υπάρχει αργινίνη και στις δύο θέσεις προσδιορίζονται οι καθοριστές οροτύπων y και r.

Το 1988, οι Okamoto et al²⁹ πρότειναν να αντικατασταθεί ή να συμπληρωθεί η ταξινόμηση του ιού σε ορότυπους με την ταξινόμηση των διαφορετικών στελεχών του HBV σε γενετικές ομάδες με βάση τη γενετική ετερογένεια, δηλαδή το ποσοστό διαφοράς της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Πιο συγκεκριμένα, για να διαχωριστούν δύο στελέχη μεταξύ τους ως διαφορετικοί γο-

νότυποι (genotypes) θα πρέπει να παρουσιάζουν διαφορά στη νουκλεοτιδική αλληλουχία $\geq 8\%$. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 8 γονότυποι του ιού (Α-Η). Στον πίνακα 2 φαίνεται η σχέση οροτύπων με τους γονότυπους, ενώ στην εικόνα 4 φαίνεται η φυλογενετική σχέση των διαφόρων γονοτύπων που μολύνουν τον άνθρωπο και τα ανώτερα πρωτεύοντα.

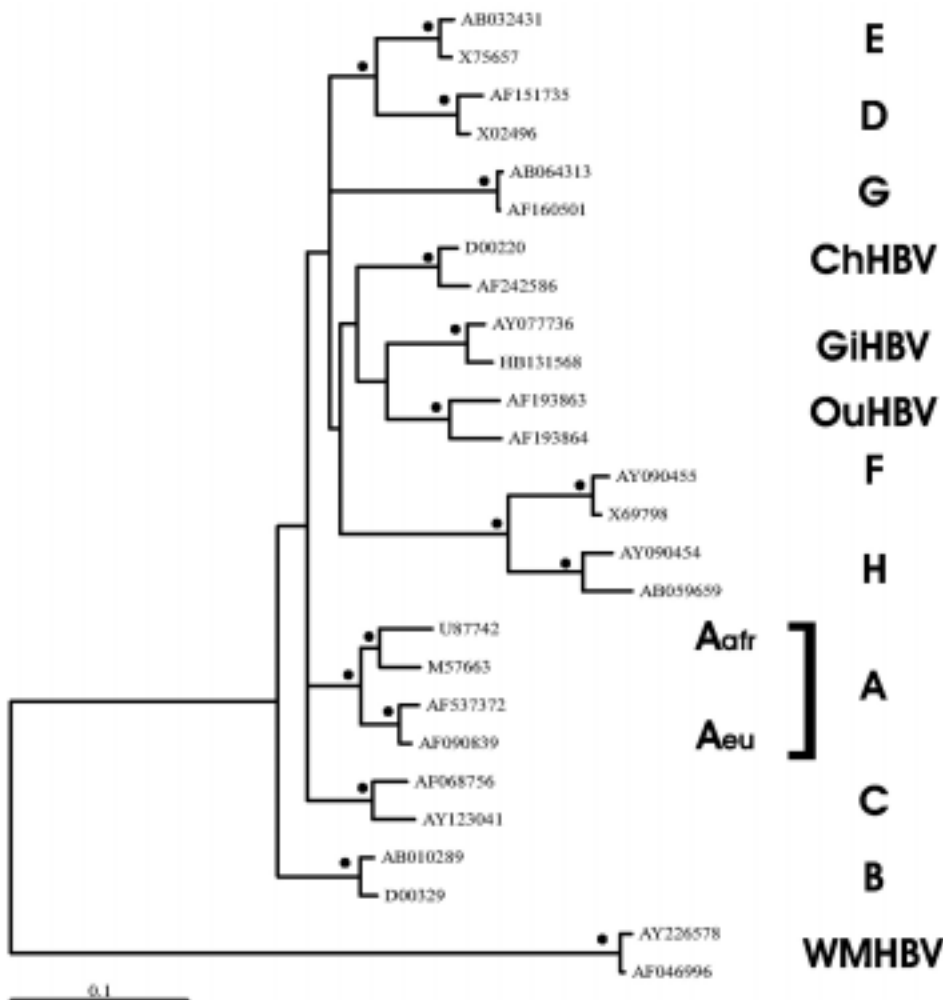
2.2. Γεωγραφική εξάπλωση των γονοτύπων-μοριακή επιδημιολογία

Ο γονότυπος Α εντοπίζεται κυρίως στη βόρεια Ευρώπη, τη βόρεια Αμερική και στην κεντρική και νότια Αφρική.³⁰ Μερικά στελέχη γονότυπου Α έχουν βρεθεί στις Φιλιππίνες,³⁰ αντανακλώντας επιδημιολογικά τη στενή σχέση αυτής της χώρας με τη βόρεια Αμερική τον 20ο αιώνα. Ο γονότυπος Α έχει επίσης βρεθεί και σε άλλα μέρη του κόσμου, γεγονός που εξηγείται με επιδημιολογικές συσχετίσεις των περιοχών αυτών με τη βορειοδυτική Ευρώπη. Είναι επίσης χαρακτηριστικό ότι ανάλυση των στελεχών του γονότυπου Α από τη νότια Αφρική έδειξε την ομαδοποίησή τους σε ξεχωριστή υποομάδα του γονότυπου Α, γνωστή ως Α' ή ως A_{af}.³¹

Οι γονότυποι Β και С εντοπίζονται κατά κύριο λόγο σε πληθυσμούς της νοτιοανατολικής Ασίας.²⁹ Η κατανο-

Πίνακας 2. Αντιστοίχιση οροτύπων-γονότυπων. Με παρένθεση αναπαριστώνται οι πιο σπάνιοι ορότυποι στον αντίστοιχο γονότυπο.

Γονότυπος	A	B	C	D	E	F	G	H
Σχετιζόμενοι ορότυποι	adw2 (ayw1)	adw2 (ayw1)	adr adrq- ayr	ayw2 ayw3 ayw4	ayw4 (adw2)	adw4q-	adw2	adw4



Εικόνα 4. Φυλογενετικό δένδρο των διαφόρων γονότυπων του ιού της ηπατίτιδας Β (οι τελείες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντική ομαδοποίηση).

μή των δύο αυτών γονότυπων είναι αλληλοεπικαλυπτόμενη, με τάση του γονότυπου C να εντοπίζεται στην Άπω Ανατολή, στη βόρεια ενδοχώρα της Ασίας (ανατολική Ασία, Ταϊβάν και Κορέα) και στην ενδοχώρα της Ιαπωνίας, ενώ ο γονότυπος B εντοπίζεται κυρίως στην Ταϊβάν, την Ιαπωνία, την Ινδονησία, την Κίνα και το Βιετνάμ.³² Ο γονότυπος B διαχωρίζεται σε τέσσερις υποομάδες: την υποομάδα Bj ή B1, η οποία βρίσκεται κυρίως στην Ιαπωνία, την υποομάδα Ba ή B2, η οποία εντοπίζεται κυρίως στην Κίνα και το Βιετνάμ, την υποομάδα B3, που βρίσκεται μόνο στην Ινδονησία, και την

υποομάδα B4, που βρίσκεται μόνο στο Βιετνάμ.³² Οι υποομάδες B2–B4 είναι στελέχη που έχουν προκύψει από ανασυνδυασμό μεταξύ του γονότυπου B και του γονότυπου C.³³ Παρόμοια, ο γονότυπος C διαχωρίζεται σε 4 υποομάδες: την υποομάδα C1 (Cs), που εντοπίζεται κυρίως σε Ιαπωνία, Κορέα και Κίνα, την υποομάδα C2 (Ce), που εντοπίζεται κυρίως σε Κίνα, νοτιοανατολική Ασία και Μπαγκλαντές, την υποομάδα C3 (Caustalia) στην Ωκεανία και την υποομάδα C4 σε πληθυσμούς Αβοριγίνων της Αυστραλίας.³²

Ο γονότυπος D είναι ο πλέον διαδεδομένος γονότυπος παγκοσμίως, με υψηλότερο επιπολασμό σε μια γεωγραφική ζώνη που εκτείνεται από τη νότια Ευρώπη και τη βόρεια Αφρική (Μεσογειακές χώρες),³⁰ τη μέση Ανατολή έως την Ινδία, τη δυτική και τη νότια Αφρική,³¹ τη βόρεια Αμερική, τη Ρωσία και την Ισπανία και ανάμεσα σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών σε όλες τις ηπείρους. Κατά παρόμοιο τρόπο, οι Norder et al³² διαχωρίζουν το γονότυπο αυτό σε 4 υποομάδες (D1-D4), χωρίς ωστόσο να υπάρχει διακριτή γεωγραφική κατανομή.

Ο γονότυπος E είναι συγγενικός του γονότυπου D, αφού στην περιοχή X ταξινομείται φυλογενετικά ως υποομάδα του γονότυπου D.³⁴ Η κύρια εντόπιση του γονότυπου E είναι η δυτική και νότια Αφρική³⁵ και ίσως να αντιπροσωπεύει και τον αρχαιότερο γονότυπο.

Ο περισσότερο αποκλίνων γονότυπος F έχει βρεθεί στη νότια και την κεντρική Αμερική.³⁶ Έχει απομονωθεί σε ιθαγενείς στη γαλλική Πολυνησία, στην Αργεντινή, σε ινδιάνους της Βενεζουέλας^{26,37} και σε άλλους γηγενείς πληθυσμούς της λεκάνης του Αμαζονίου. Αν και παρουσιάζει κοινά δομικά στοιχεία με το γονότυπο A, πιστεύεται ότι η προέλευση του γονότυπου αυτού είναι από πρωτεύοντα του Νέου Κόσμου. Ο γονότυπος F διαχωρίζεται σε 4 υποομάδες (F1-F4), με την υποομάδα F1 να διαχωρίζεται περαιτέρω σε δύο διακριτές ομάδες (F1a-F1b).^{32,38}

Ο γονότυπος G έχει βρεθεί μέχρι στιγμής στη Γαλλία, στις Ηνωμένες Πολιτείες³⁸ και στο Μεξικό.³⁹ Οι ομοιότητες που παρουσιάζει με το γονότυπο E (έλλειψη 30 νουκλεοτιδίων στην περιοχή της προ-επιφανειακής πρωτεΐνης) και το γεγονός ότι το 1/3 των περιστατικών γονότυπου G έχουν ταυτοποιηθεί στο San Francisco, όπου εκδηλώθηκαν τα πρώτα κρούσματα HIV-λοίμωξης, προτείνουν ως πιθανή προέλευση του γονότυπου αυτού την Αφρική.⁴⁰

Ο πρόσφατα περιγραφείς γονότυπος H⁴¹ παρουσιάζει στενή φυλογενετική σχέση με το γονότυπο F κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματός του και έχει απομονωθεί από τις Ηνωμένες Πολιτείες και από την κεντρική Αμερική. Ο γονότυπος H πιθανολογείται ότι προήλθε από το γονότυπο F στο Νέο Κόσμο.

Σε πολλές χώρες, γνωστά κύματα μετανάστευσης έχουν συμβεί επηρεάζοντας την κατανομή των γονοτύπων στις χώρες αυτές. Η προέλευση των μεταναστών ταυτίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις με τον επιπολασμό των γονοτύπων σε αυτούς.⁴²

Η κατανομή των γονοτύπων φαίνεται να επηρεάζεται όχι μόνο από τη γεωγραφική κατανομή, αλλά και από

τον τρόπο μετάδοσης σε μια δεδομένη περιοχή. Σε μια πρόσφατη μελέτη των Koibuchi et al,⁴³ Ιάπωνες ομοφυλόφιλοι με συλλοίμωξη με HIV έφεραν στελέχη του γονότυπου A αντί του C και B, που κυριαρχούν στην Ιαπωνία.

Όσον αφορά στα πρωτεύοντα, η λοίμωξη με HBV στο φυσικό περιβάλλον φαίνεται να περιορίζεται μόνο στους μεγάλους πιθήκους του Παλαιού Κόσμου (γορίλας, χιμπατζής, ουρακοτάγκος, γίβωνας) και στους δασύτρικους πιθήκους του Νέου Κόσμου. Ο ιός δεν έχει ανιχνευτεί μέχρι στιγμής στα μικρότερα πρωτεύοντα του παλαιού κόσμου (*Cercopithecidae*), καθώς και στα άλλα πρωτεύοντα του νέου κόσμου (*Saimiri sciureus*, *Callithrix jacchus* και *Saguinus oedipus*). Ενδιαφέροντα περιστατικά, που υποστηρίζουν διάσπαση των φραγμών μεταξύ των ειδών όσον αφορά στη μετάδοση στελεχών του HBV, αποτελούν η περίπτωση απομόνωσης μιας αλληλουχίας HBV από γορίλα (ονομαζόμενη GoHBV, AJ131567), που ομαδοποιείται με την ομάδα των αλληλουχιών του χιμπατζή, μιας αλληλουχίας χιμπατζή, που ομαδοποιείται με τον HBV που μολύνει τους γίβωνες, καθώς και τριών αλληλουχιών, που έχουν απομονωθεί από χιμπατζήδες και ομαδοποιούνται με τους ανθρώπινους γονότυπους A, C και E.^{3,44,45}

Φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών που έχουν απομονωθεί από τα διάφορα πρωτεύοντα του παλαιού κόσμου απέδειξε γεωγραφική ομαδοποίηση των διαφόρων στελεχών, παρά ειδική κατά είδος κατανομή. Πιο συγκεκριμένα, ο γονότυπος του HBV που μολύνει χιμπατζήδες μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις υπότυπους, με βάση τα τρία διαφορετικά υποείδη χιμπατζή που κατοικούν στην Αφρική (*Pan t. troglodytes*, *Pan t. verus*, *Pan t. vellerosus*),⁴⁶ ενώ ο γονότυπος που μολύνει τους γίβωνες κατατάσσεται σε τέσσερις διαφορετικούς υπότυπους: 2 υπότυποι, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από το είδος *Hylobates pilleatus*, ένας υπότυπος από το είδος *Hylobates lar* και ένας υπότυπος που μολύνει είδη του γένους *Nomascus*.^{46,47} Ο γονότυπος που μολύνει τους ουρακοτάγκους (OuhV) θεωρείται συγγενικός με εκείνον των γιβώνων.⁴⁶

2.3. Ανασυνδυασμός μεταξύ των γονοτύπων

Η σύγκριση φυλογενετικών δένδρων από διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος διαφόρων στελεχών του HBV καταδεικνύει σημαντικές διαφορές στην ομαδοποίησή τους από περιοχή σε περιοχή. Η σημασία του ανασυνδυασμού και ο ρόλος του στη γενετική ποικιλομορφία του HBV επισημάνθηκε πρόσφατα, όταν δημοσιεύτηκαν και τα πρώτα στοιχεία σχετικά με τον ανα-

συνδυασμό στον HBV.^{33,34,48} Ο λόγος για τον οποίο υποεκτιμήθηκε ο ρόλος του ανασυνδυασμού είναι προφανώς γιατί όλες σχεδόν οι μελέτες ανάλυσης γονοτύπων του HBV βασίστηκαν στις φυλογενετικές σχέσεις ολόκληρου του γονιδιώματος, όπως αυτές ορίστηκαν από τους Okamoto et al,²⁹ χωρίς να υπεισέρχονται σε λεπτομερή ανάλυση.

Η σημερινή εικόνα που υπάρχει για τους γονότυπους έχει διαμορφωθεί σε σημαντικό βαθμό μέσω γεγονότων ανασυνδυασμού. Οι γονότυποι E και G φαίνεται να έχουν προκύψει με ανασυνδυασμό των γονοτύπων D και A με μη ταυτοποιημένα στελέχη.^{34,49} Ανασυνδυασμός μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων έχει αναφερθεί για τους γονότυπους A και D, B και C, A και C, μεταξύ F και A, μεταξύ A και E, G και C και μεταξύ C και D, δημιουργώντας μεγαλύτερο εύρος ποικιλομορφίας του ιού.^{34,48,50-52} Επιπλέον, πρόσφατα περιγράφηκε ένα στέλεχος που έχει απομονωθεί από χιμπατζή της ανατολικής Αφρικής (*Pan troglodytes schweinfurthii*), το οποίο έχει προκύψει ως προϊόν ανασυνδυασμού μεταξύ του γονότυπου ChHBV και του HBV γονότυπου C⁵³ (εικ. 5).

3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥΣ ΣΗΜΑΣΙΑ

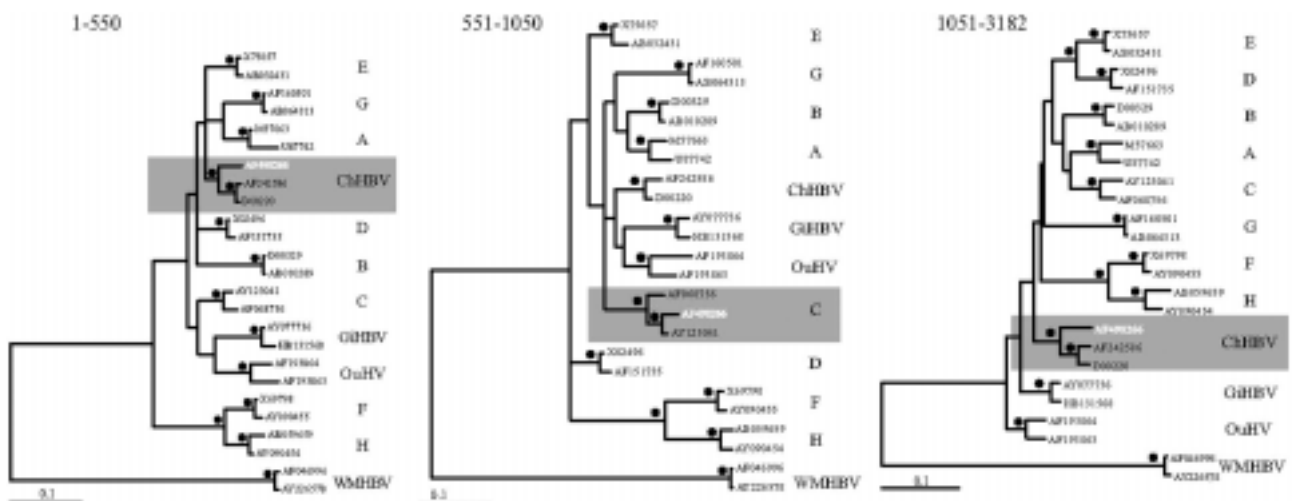
3.1. Βιολογικά χαρακτηριστικά των γονοτύπων

Οι κύριες διαφορές όσον αφορά στο γονιδίωμα διαφόρων μελών των ιών hepadna εντοπίζονται μεταξύ των ortho και των avi hepadnavirus. Το DNA του DHBV

είναι σχεδόν δίκλωνο, ενώ το DNA των orthohepadnaviridae είναι μερικώς δίκλωνο. Οι τελευταίοι έχουν δύο προ-επιφανειακές πρωτεΐνες, την προ-επιφανειακή πρωτεΐνη 1 και 2 (pre-S1, pre-S2), ενώ οι avihepadnaviridae έχουν μόνο μία. Επίσης, δεν έχει εντοπιστεί γονίδιο X στους avihepadnaviridae, αν και υπάρχουν ενδείξεις για μια πρωτεΐνη, που ίσως μοιάζει με την πρωτεΐνη X.

Οι γονότυποι παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (εισδοχές και ελλείψεις). Για παράδειγμα, ο γονότυπος A διαφέρει από τους υπόλοιπους γονότυπους στο γεγονός ότι υπάρχει μια εισδοχή 6 νουκλεοτιδίων στην τελική πρωτεΐνη (terminal protein) του γονιδίου της πολυμεράσης, ενώ ο γονότυπος D έχει μια έλλειψη 33 νουκλεοτιδίων στη συνδετική περιοχή (spacer) της πολυμεράσης, η οποία αλληλοεπικαλύπτεται με την περιοχή της προ-επιφανειακής πρωτεΐνης 1,⁵⁴ κάτι το οποίο δεν έχει παρατηρηθεί στο γονότυπο E, ο οποίος είναι ο πλέον συγγενικός με τον D.³⁴ Οι γονότυποι E και G έχουν έλλειψη 3 νουκλεοτιδίων στη συνδετική περιοχή. Επιπλέον, ο γονότυπος G έχει μια εισδοχή 36 νουκλεοτιδίων στο αμινοτελικό άκρο του γονιδίου του πυρήνα.³⁸

Διαφορές μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων παρουσιάζονται και στη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων κλινικής σημασίας. Δύο τέτοιες κύριες ομάδες μεταλλάξεων έχουν ταυτοποιηθεί, οι οποίες οδηγούν σε μείωση ή αναστολή της σύνθεσης της HBeAg. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τη δημιουργία κωδικονίου λήξης της με-



Εικόνα 5. Φυλογενετικά δένδρα της ανασυνδυασμένης αλληλουχίας AF498266, που απομονώθηκε από το υποείδος του χιμπατζή *Pan troglodytes schweinfurthii* στις περιοχές με διαφορετική τοπολογία ενδεικτική ανασυνδυασμού. Στην περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 550-1050 ομαδοποιείται με το γονότυπο C, ενώ στις περιοχές 1-550 και 550-3182 ομαδοποιείται με τον HBV που μολύνει χιμπατζίδες (ChHBV) (οι τελείες αντιπροσωπεύουν στατιστικά σημαντική ομαδοποίηση).⁵³

τάφρασης στο νουκλεοτίδιο 1896 (κωδικόνιο 28:TGG, τρυπτοφάνη) στο γονίδιο της προπυρηνικής πρωτεΐνης (προπυρηνική μετάλλαξη). Η δεύτερη ομάδα μεταλλάξεων επηρεάζει τον υποκινητή BCP στα νουκλεοτίδια 1762 και 1764, οδηγώντας σε καταστολή της μεταγραφής του pre-C/C mRNA.

Η προπυρηνική μετάλλαξη σχετίζεται με την οροαρνητική HBeAg χρόνια ηπατίτιδα. Κατά κανόνα, η μετάλλαξη σε χρόνιες λοιμώξεις εμφανίζεται σε άτομα άρρενα, ηλικίας 40–55 ετών, τα οποία είναι ασυμπτωματικά και τα οποία ταυτοποιούνται ως χρόνιοι φορείς μετά από τυχαίο έλεγχο για αυστραλιανό αντιγόνο κατά την αιμοδοσία ή από ασυμπτωματική αύξηση των τρανσαμινασών. Σε γενικές γραμμές, η κλινική πορεία της νόσου δεν διαφέρει από τη χρόνια οροθετική HBeAg ηπατίτιδα Β. Κατά την πορεία της νόσου, ωστόσο, δύο πρότυπα εξέλιξης εμφανίζονται: (α) επίμονα αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών (τιμές ALT τριπλάσιες ή και τετραπλάσιες του φυσιολογικού στο 30–40% των περιστατικών χωρίς τάση για αυτόματη υποχώρηση των τιμών αυτών), (β) ανώμαλα πρότυπα αλλαγών των τρανσαμινασών με συχνές υποτροπές ηπατικής νόσου (45–65% των περιστατικών). Πολλές φορές, οι υποτροπές αυτές μιμούνται οξεία ηπατίτιδα, με επίπεδα τρανσαμινασών >1000 IU/L και θετικό IgM anti-HBc. Εργαστηριακά, η διάγνωση βασίζεται στον ορολογικό έλεγχο. Πιο συγκεκριμένα, απαιτείται (α) θετικό HBsAg, αρνητικό HBeAg για >6 μήνες και κατά προτίμηση ένα έτος, (β) αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών (ALT), είτε επίμονα είτε διαλείποντα, (γ) απόδειξη πολλαπλασιασμού του ιού με μέτρηση HBV-DNA (τιμή >10⁵ αντίγραφα/mL) του ορού ή και HBcAg στο ήπαρ. Σε περίπτωση που οι τελευταίες εξετάσεις αποθούν αρνητικές, απαιτείται επαναλαμβανόμενος έλεγχος σε τακτά χρονικά διαστήματα για την εκτίμηση της ηπατικής βλάβης και της συσχέτισής της με τη HBV-λοίμωξη. Οι περισσότεροι ασθενείς με HBeAg-αρνητική ηπατίτιδα έχουν προχωρημένο στάδιο ίνωσης κατά τη στιγμή της διάγνωσης λόγω της ασυμπτωματικής και μακρόχρονης πορείας της νόσου.⁵⁵ Η αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη στο νουκλεοτίδιο 1896 οδηγεί σε κωδικόνιο λήξης (TGG σε TAG □ UGG σε UAG στο mRNA) στο προτελευταίο κωδικόνιο (κωδικόνιο 28) του γονιδίου της προπυρηνικής πρωτεΐνης που εντοπίζεται στη δομή ε. Στη δομή ε, το νουκλεοτίδιο G1986 σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το νουκλεοτίδιο 1858 στη βάση της. Στους γονότυπους Β, D, E, σε μερικά στελέχη του γονότυπου C και στην υποομάδα F1, στη θέση 1858 υπάρχει θυμίνη (Τ). Έτσι, το κωδικόνιο λήξης που δημιουργείται από την αντικατάσταση G1896A (T-A) σταθεροποιεί τη δομή ε. Σε αντίθεση με αυτό, η

μετάλλαξη που δημιουργεί κωδικόνιο λήξης στο πλαίσιο ανάγνωσης της προπυρηνικής πρωτεΐνης εντοπίζεται σπάνια στους γονότυπους A, F2, Η και σε μερικά στελέχη του γονότυπου C, αφού στη θέση 1858 βρίσκεται κυτοσίνη (C), διατηρώντας έτσι το προτιμώμενο ζευγάρι G-C. Στο γονότυπο G, η ύπαρξη A στο νουκλεοτίδιο G1986 συνδυάζεται πάντα με την παρουσία A στη θέση 1858, με αποτέλεσμα στο γονότυπο αυτό συστηματικά να μην παράγεται HBeAg. Από τα παραπάνω εξηγείται γιατί η προπυρηνική μετάλλαξη εμφανίζεται συχνότερα στους γονότυπους Β, D, E, F1 σε σύγκριση με τους γονότυπους A, F2 και Η.^{56–58} *De novo* στελέχη τα οποία φέρουν την προπυρηνική μετάλλαξη και δεν παράγουν HBeAg δεν μπορούν να εγκαταστήσουν χρόνια λοίμωξη, όπως φαίνεται από εργαστηριακές αλλά και κλινικές μελέτες.^{59,60} Η εμφάνιση της μεταλλαγής γίνεται είτε στην πορεία της HBV-λοίμωξης ανάλογα με το γονότυπο του ασθενούς είτε *ad initio* με συλλοίμωξη ενός στελέχους το οποίο δεν φέρει τη μετάλλαξη και αποτελεί τον κυρίαρχο πληθυσμό και ενός στελέχους που φέρει τη μετάλλαξη και αποτελεί μικρότερο υποπληθυσμό. Κατά κανόνα, η μετάλλαξη σε χρόνιες λοιμώξεις εμφανίζεται σε άτομα άρρενα, ηλικίας 40–55 ετών, τα οποία είναι ασυμπτωματικά και τα οποία ταυτοποιούνται ως χρόνιοι φορείς μετά από τυχαίο έλεγχο για αυστραλιανό αντιγόνο κατά την αιμοδοσία ή από ασυμπτωματική αύξηση των τρανσαμινασών. Κατά την πορεία της νόσου, δύο πρότυπα εξέλιξης της νόσου εμφανίζονται: (α) επίμονα αυξημένα επίπεδα τρανσαμινασών (τιμές τριπλάσιες ή και τετραπλάσιες του φυσιολογικού στο 30–40% των περιστατικών χωρίς τάση για αυτόματη υποχώρηση των τιμών αυτών), (β) ανώμαλα πρότυπα αλλαγών των τρανσαμινασών με συχνές υποτροπές ηπατικής νόσου (45–65% των περιστατικών). Πολλές φορές, οι υποτροπές αυτές μιμούνται οξεία ηπατίτιδα με επίπεδα τρανσαμινασών >1000 IU/L και θετικό IgM anti-HBc.

Τρεις άλλες μεταλλάξεις (στα νουκλεοτίδια 1817, 1874, 1897) προκαλούν μείωση του μήκους της πρωτεΐνης HBeAg. Επιπλέον, αλλαγές που επηρεάζουν το κωδικόνιο έναρξης μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1814–1816 έχουν επίσης περιγραφεί.^{61,62} Η μετάλλαξη G1899A ανιχνεύεται συχνά σε συνδυασμό με τη μετάλλαξη G1896A.⁶² Αρχικές μελέτες είχαν προτείνει ότι η μετάλλαξη G1896A είναι σημαντικός προγνωστικός δείκτης της λοιμογόνου δύναμης του ιού (virulence), η οποία ευθύνεται για σοβαρή ηπατική νόσο και κεραυνοβόλο ηπατίτιδα.^{62,63} Είναι σαφές από κλινικές και πειραματικές μελέτες ότι στελέχη που φέρουν την προπυρηνική μετάλλαξη σπάνια εγκαθιδρύουν χρόνια λοίμωξη.⁶⁴

Η μετάλλαξη έχει εντοπιστεί και σε ασυμπτωματικούς φορείς.⁶⁵

Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή BCP, όπως η μετάλλαξη A1762T και η G1764A, μπορούν να βρεθούν σε συνδυασμό ή όχι με προπυρηνικές μεταλλάξεις σε συνάρτηση πάντα με το γονότυπο. Η διπλή μετάλλαξη A1762T+G1764A οδηγεί σε ελάττωση της παραγωγής του HBeAg κατά 70% περίπου.⁶⁶ Ο μεταλλαγμένος υποκινητής BCP εμφανίζει μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης με ηπατικούς μεταγραφικούς παράγοντες, οδηγώντας σε μείωση της μεταγραφής του pre-C/C mRNA και σε μειωμένη ποσότητα προπυρηνικής πρωτεΐνης. Ωστόσο, η μετάλλαξη αυτή δεν επηρεάζει τη μεταγραφή του προγονιδιωματικού RNA ή τη μετάφραση της πυρηνικής πρωτεΐνης και της πολυμεράσης. Οι μεταλλάξεις στον υποκινητή BCP φαίνεται να ενισχύουν έμμεσα την ιική αντιγραφή μέσω καταστολής της σύνθεσης του pre-C/C mRNA και του προγονιδιωματικού RNA.⁶⁶ Όπως και με τις προπυρηνικές μεταλλάξεις, οι μεταλλάξεις στον υποκινητή BCP δεν έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως ως πιθανοί παράγοντες καθορισμού της λοιμογόνου δύναμης του ιού. Υπάρχουν μελέτες, ωστόσο, που προτείνουν τη σχέση των μεταλλάξεων αυτών με ηπατική κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο.^{62,63} Μελέτες έχουν δείξει σημαντικές διαφορές όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης BCP στους διάφορους γονότυπους. Πιο συγκεκριμένα, η μετάλλαξη αυτή εμφανίζεται συχνότερα στο γονότυπο C σε σχέση με το γονότυπο B.⁵⁷

Μια άλλη ομάδα μεταλλαγών με εξέχουσα κλινική σημασία είναι οι ελλείψεις στην περιοχή της προεπιφανειακής πρωτεΐνης και οι μεταλλαγές διαφυγής (escape mutants) στα εμβόλια της ηπατίτιδας Β. Οι ελλείψεις στην προεπιφανειακή πρωτεΐνη φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα του ιού σε διαγονιδιακά ποντίκια και αυξημένη εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκίνου.⁶⁷ Αυξημένος επιπολασμός τέτοιων στελεχών έχει βρεθεί σε ασθενείς με χειρότερη κλινική πορεία της νόσου και σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο.^{68,69} Η παρουσία της μεταλλαγής αυτής φαίνεται να επηρεάζεται από το γονότυπο του στελέχους.⁶⁹ Η μεταλλαγή αυτή φαίνεται να είναι συχνότερη στους γονότυπους B και C, ενώ είναι σημαντικά πιο σπάνια στους γονότυπους A, D, E και F.⁷⁰ Όσον αφορά στις μεταλλαγές διαφυγής, συχνότερη είναι η εμφάνιση αυτών των μεταλλαγών σε στελέχη όπου ο ορότυπος περιέχει τον αντιγονικό καθοριστή *y* έναντι του *d*,⁷¹ ενώ οι Ngui et al⁷² έδειξαν ότι σε παιδιά που γεννήθηκαν από οροθετικές μητέρες γονότυπου C και ακολούθησαν το συμβατικό πρωτόκολλο εμβολιασμού-προφύλαξης, η εμφάνιση τέτοιων στελεχών ήταν περισσότερο σπάνια. Αξίζει να

σημειωθεί ότι η πρώτη αναφορά τέτοιου στελέχους ήταν ένα περιστατικό γονότυπου A σε μια περιοχή στην οποία επικρατούσε ο γονότυπος D.⁷³

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η μελέτη των Sugauchi et al,⁷⁴ στην οποία συνέκριναν το γονότυπο Ba, ο οποίος αποτελεί στην ουσία ανασυνδυασμένο γονότυπο B με το γονότυπο C, με το γονότυπο Bj (γονότυπος B). Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι η συχνότητα της μετάλλαξης BCP ήταν υψηλότερη στο γονότυπο Ba απ' ό,τι στο γονότυπο Bj (33% έναντι 15%, $P < 0,05$), ενώ η παρουσία HBeAg ήταν συχνότερη στο γονότυπο Ba παρά στον Bj (35% έναντι 18%, $P < 0,05$). Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη ένδειξη ότι ίσως τα ανασυνδυασμένα στελέχη να παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες από τα μη ανασυνδυασμένα. Στον πίνακα 3 φαίνονται, συνοπτικά, οι διαφορές μεταξύ των γονοτύπων B και C και μεταξύ των γονοτύπων D και A.

3.2. Κλινικά χαρακτηριστικά των γονοτύπων

Σημαντικές διαφορές όσον αφορά στην παθογένεια και την ανταπόκριση στη θεραπεία μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων έχουν εντοπιστεί από διάφορες μελέτες.

3.2.1. Διαφορές στην παθογένεια και την πρόγνωση της νόσου. Ο γονότυπος C εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με κίρρωση και σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο ηλικίας >50 ετών, σε σύγκριση με ασυμπτωματικούς φορείς ίδιας ηλικίας (age-matched).⁷⁵ Αντίθετα, ο γονότυπος B απομονώνεται κυρίως από ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο ηλικίας <50 ετών, σε σύγκριση με ασυμπτωματικούς φορείς ίδιας ηλικίας. Η συχνότητα του γονότυπου B ήταν μεγαλύτερη (90%) σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο ηλικίας <35 ετών, χωρίς όμως κίρρωση ήπατος στην πλειονότητά τους. Η συσχέτιση του γονότυπου C με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και ηπατικής κίρρωσης επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες.⁷⁶⁻⁷⁹ Μελέτες από την Ταϊβάν έδειξαν ότι τα στελέχη του γονότυπου B διαχωρίζονται σε τρεις ομάδες, ανάλογα με την εξέλιξη της ηπατικής νόσου [αργά εξελισσόμενος τύπος με πρώιμη αρνητικοποίηση του HBeAg, ταχέως εξελισσόμενος τύπος με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (hepatocellular carcinoma, HCC) σε νεαρούς φορείς, ενδιάμεσα εξελισσόμενος τύπος με κίρρωση και HCC σε έδαφος κίρρωσης την έκτη δεκαετία ζωής]. Οι διαφορές που παρουσιάζουν τα διαφορετικά στελέχη του γονότυπου «B» από την Ταϊβάν θα μπορούσαν να εξηγηθούν από τον ανασυνδυασμό με το γονότυπο C, αφού η γονοτύπωση στη συγκεκριμένη εργασία έγινε στην περιοχή της επιφανειακής πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας την τεχνική PCR-RFLPs.⁷⁵

Πίνακας 3. Βιολογικές και κλινικές διαφορές μεταξύ των γονοτύπων Β και C (Α) και μεταξύ των γονοτύπων D και Α (Β).

Χαρακτηριστικό	Γονότυπος C	Γονότυπος B
<i>Βιολογικές διαφορές</i>		
Οροθετικότητα ΗΒεΑg	Συχνή	Λιγότερο συχνή
Φάση ανοσιακής κάθαρσης	Παρατεταμένη	Σύντομη
Σοβαρότητα οξειών υποτροπών	Υψηλότερη	Χαμηλότερη
Ιστολογική ενεργότητα	Υψηλότερη	Χαμηλότερη
Επίπεδα HBV-DNA	Υψηλότερα	Χαμηλότερα
Συχνότητα προπυρηνικής μετάλλαξης	Χαμηλή	Υψηλή
Συχνότητα πυρηνικής μετάλλαξης BCP	Υψηλή	Χαμηλή
Ανταπόκριση στη θεραπεία με ιντερφερόνη	Χειρότερη	Καλύτερη
Πρόγνωση (κίρρωση, ηπατοκυτταρικός καρκίνος)	Χειρότερη	Καλύτερη (Ιαπωνία Κίνα), ποικίλη (Ταϊβάν)
Χαρακτηριστικό	Γονότυπος D	Γονότυπος A
<i>Κλινικές διαφορές</i>		
Κλινική εικόνα	Οξεία ηπατίτιδα	Χρόνια ηπατίτιδα
Ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου	Πιθανότερη	Λιγότερο πιθανή
Συχνότητα προπυρηνικής μετάλλαξης	Υψηλότερη	Χαμηλότερη
Συχνότητα της μετάλλαξης στο BCP	Χαμηλότερη	Υψηλότερη
Ανταπόκριση στη θεραπεία με ιντερφερόνη	Χειρότερη	Καλύτερη
Ανταπόκριση στη θεραπεία με λαμβουδίνη	Καλύτερη	Χειρότερη

Οι Sanchez-Tapias et al⁸⁰ έδειξαν ότι ο γονότυπος Α σχετίζεται με ομαλοποίηση των βιοχημικών παραμέτρων και εκκαθάριση του HBV-DNA περισσότερο συχνά απ' ό,τι ο γονότυπος D ή ο F, ενώ ο ρυθμός εκκαθάρισης του HBsAg ήταν υψηλότερος στο γονότυπο Α απ' ό,τι στο γονότυπο D. Σε μια άλλη μελέτη των Thakur et al⁸¹ από την Ινδία, ασθενείς με γονότυπο D εμφάνιζαν σοβαρότερη ηπατική νόσο σε σχέση με το γονότυπο Α (61% έναντι 30%, $P < 0,05$) και είχαν μεγαλύτερες πιθανότητες εκδήλωσης HCC σε ηλικία <40 ετών (63% έναντι 44%, $P = 0,06$).

Σε μια άλλη μελέτη, των Kobayashi et al,⁸² συγκρίθηκε ο επιπολασμός των γονοτύπων σε 57 ασθενείς με οξεία και 1077 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα. Η κατανομή είχε ως εξής: γονότυπος Α (οξεία 22% έναντι χρόνιας 1,9%, $P < 0,00001$), γονότυπος Β (14% έναντι 9,4%), γονότυπος C (43,9% έναντι 87,7%, $P = 0,004$), γονότυπος D (1,8% έναντι 0,2%), γονότυπος F (1,8% έναντι 0,2%) και απροσδιόριστου γονότυπου (15,8% έναντι 0,6%, $P = 0,001$).

Σημαντικές διαφορές όσον αφορά στη συχνότητα χρονιότητας της νόσου παρατηρήθηκε σε μια μελέτη των Duong et al⁸³ μεταξύ των γονοτύπων C και D (63% έναντι 16%, $P < 0,001$).

Πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι οι συσχετίσεις των γονοτύπων με τα κλινικά χαρακτηριστικά στις παραπά-

νω μελέτες είναι δυνατόν να οφείλονται σε συστηματικά σφάλματα οφειλόμενα στη διάρκεια ή την ηλικία της λοίμωξης. Επιπλέον, πρέπει να τονιστεί ότι επειδή σε πολλές μελέτες η γονοτύπωση περιορίζεται σε μία μόνο γενετική περιοχή του HBV και δεν βασίζεται σε πλήρους μήκους αλληλουχία, ο πιθανός ρόλος του ανασυνδυασμού έχει υποεκτιμηθεί.

3.2.2. Διαφορές στην ανταπόκριση στην ιντερφερόνη.
Η πρώτη μικρή μελέτη που δημοσιεύτηκε για τη συσχέτιση γονοτύπων με την ανταπόκριση στην ιντερφερόνη ήταν των Zhang et al. Οι Zhang et al⁸⁴ συνέκριναν την ανταπόκριση στην ιντερφερόνη μεταξύ 10 ασθενών γονότυπου Α και 21 ασθενών γονότυπου D ή E, οι οποίοι ήταν όλοι θετικοί για αντι-ΗΒε αντισώματα. Η ανταπόκριση στην ιντερφερόνη ήταν υψηλότερη σε ασθενείς γονότυπου Α σε σύγκριση με εκείνων γονότυπου D ή E (70% έναντι 40%, $P = 0,001$).

Μια μελέτη των Kao et al⁸⁵ σε ασθενείς γονότυπου Β και C, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ιντερφερόνη-α, έδειξε ότι η ανταπόκριση στη θεραπεία, χρησιμοποιώντας ως δείκτη την ομαλοποίηση των τρανσαμινασών, την αρνητικοποίηση του ΗΒεΑg και τα επίπεδα του HBV-DNA μετά από την παρόδο 48 εβδομάδων από την έναρξη της θεραπείας, ήταν 41% και 15%, αντίστοιχα, για τους ασθενείς με γονότυπο Β και C ($P = 0,045$). Σε αυτούς με υψηλότερες συγκεντρώσεις τρανσαμινασών,

το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 50% και 17%, αντίστοιχα ($P=0,025$). Επιπλέον, η νεαρή ηλικία και ο γονότυπος Β σχετίζονταν με καλύτερη ανταπόκριση στην ιντερφερόνη-α. Τα αποτελέσματα προτείνουν ότι ο γονότυπος C, σε σύγκριση με το γονότυπο Β, σχετίζεται με υψηλότερη συχνότητα επίπτωσης της μετάλλαξης στον υποκινητή της προπυρηνικής πρωτεΐνης και μικρότερη ανταπόκριση στην ιντερφερόνη. Σε άλλη μελέτη, οι Wai et al⁸⁶ συνέκριναν την ανταπόκριση σε ιντερφερόνη μεταξύ ασθενών που είχαν τυχαίοποιηθεί για τη λήψη εικονικού φαρμάκου (placebo). Βρέθηκε ότι η ανταπόκριση στην ιντερφερόνη ήταν καλύτερη για ασθενείς γονότυπου Β σε σχέση με το γονότυπο C (39% έναντι 17%, $P=0,034$), ενώ ο ρυθμός ανταπόκρισης δεν διέφερε μεταξύ των δύο γονοτύπων για την ομάδα των ασθενών που έλαβαν εικονικό φάρμακο.

Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και για τους γονότυπους Α και D.^{87,88} Στη μελέτη των Hou et al⁸⁷ δείχθηκε ότι τα ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία με ιντερφερόνη-α ήταν υψηλότερα για τους ασθενείς γονότυπου Α (33%) παρά στους ασθενείς με γονότυπο D (11%, $P=0,03$). Στελέχη του γονότυπου Α είχαν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της μετάλλαξης στον υποκινητή της προπυρηνικής πρωτεΐνης σε σχέση με στελέχη του γονότυπου D (45% έναντι 12%, $P=0,002$). Αντίθετα, η προπυρηνική μετάλλαξη G1896A ήταν συχνότερη στο γονότυπο D παρά στον Α (43% έναντι 6,5%, $P=0,0001$).

Οι Cooksley et al⁸⁸ έδειξαν ότι η ανταπόκριση στην πεγκυλιωμένη ή μη ιντερφερόνη ήταν υψηλότερη για το γονότυπο Β απ' ό,τι για το γονότυπο C (33% έναντι 21% ή 25% έναντι 6%, αντίστοιχα). Πολύ σημαντική είναι μια πρόσφατη μελέτη των Janssen et al,⁸⁹ οι οποίοι μελέτησαν την ανταπόκριση ασθενών γονοτύπων Α, Β, C και D σε πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-α καθώς και σε συνδυαστική θεραπεία πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης-α με λαμβουδίνη, όπου 136 ασθενείς έλαβαν μονοθεραπεία ενώ 130 ασθενείς συνδυαστική θεραπεία. Στο τέλος της θεραπείας (52η εβδομάδα), το ποσοστό ανταπόκρισης στην ομάδα που ελάμβανε συνδυαστική θεραπεία ήταν υψηλότερο από το αντίστοιχο της ομάδας που ελάμβανε μονοθεραπεία σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, όπως φάνηκε από τα ποσοστά αρνητικοποίησης του πρώιμου αντιγόνου (HBeAg) (44% έναντι 29%, $P=0,01$) και ελάττωσης του ιικού φορτίου (HBV-DNA) <200.000 αντίγραφα/mL (74% έναντι 29%, $P<0,001$) ή <400 αντίγραφα/mL (33% έναντι 10%, $P<0,001$). Στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι ο γονότυπος του HBV αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη ανταπόκρισης στην ιντερφερόνη. Έτσι, ασθενείς γονότυπου Α είχαν μεγαλύτερες πιθανότητες να ανταποκριθούν στην ιντερφερόνη σε σχέση με ασθενείς γονότυπου D [σχετικός κίνδυνος

2,4 (95% CI 1,3–4,6), $P=0,01$] ή C [σχετικός κίνδυνος 3,6 (1,4–8,9), $P=0,006$] χρησιμοποιώντας ως δείκτη ανταπόκρισης την αρνητικοποίηση του πρώιμου αντιγόνου. Ασθενείς γονότυπου Β είχαν ελαφρά μεγαλύτερες πιθανότητες ανταπόκρισης στην ιντερφερόνη σε σχέση με ασθενείς γονότυπου C, χωρίς αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό [σχετικός κίνδυνος 2,2 (0,7–7,0), $P=0,18$]. Στην ίδια επίσης μελέτη, το χαμηλό ιικό φορτίο [σχετικός κίνδυνος 1,6 (1,3–1,8), $P=0,009$], οι υψηλές συγκεντρώσεις ALT [σχετικός κίνδυνος 1,1 (1,0–1,2), $P=0,02$] και η μη παρελθούσα χορήγηση ιντερφερόνης [σχετικός κίνδυνος 2,2 (1,1–4,5), $P=0,04$] ήταν ευνοϊκοί προγνωστικοί παράγοντες ανταπόκρισης στη θεραπεία.

3.2.3 Διαφορές στην ανταπόκριση στη λαμβουδίνη και σε άλλα νουκλεοσιδικά ανάλογα. Όσον αφορά στη θεραπεία με λαμβουδίνη, μελέτες των Zollner et al^{56,90} παρουσίασαν δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι ασθενείς με ορότυπο adw είχαν 20 φορές υψηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν αντοχή στη λαμβουδίνη σε σχέση με ασθενείς με ορότυπο agw, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με παράλληλες αλλαγές στην επιφανειακή πρωτεΐνη λόγω μεταλλάξεων. Επιπλέον, όσον αφορά στην αντοχή στη λαμβουδίνη, τα στελέχη του γονότυπου Α επέλεξαν διαφορετικό πρότυπο αντοχής απ' ό,τι τα στελέχη γονότυπου D. Πιο συγκεκριμένα, ο γονότυπος D φαίνεται να επιλέγει τη μετάλλαξη 173L σε συνδυασμό με την 200V συχνότερα από τον υπότυπο Α, ο οποίος δείχνει προτίμηση για τη μετάλλαξη 180M σε συνδυασμό με τη 204V.⁹⁰

Πρόσφατα δεδομένα της ομάδας των Kao et al⁹¹ έδειξαν ότι ασθενείς με γονότυπο Β έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με λαμβουδίνη σε σχέση με ασθενείς γονότυπου C (23% έναντι 11%), αλλά ο κίνδυνος εμφάνισης αντοχής στη λαμβουδίνη μετά από ένα χρόνο θεραπείας δεν φαίνεται να διαφοροποιείται. Σε μια άλλη μελέτη των Chien et al,⁹² ασθενείς γονότυπου Β είχαν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με λαμβουδίνη συγκριτικά με ασθενείς γονότυπου C [38/62 (61%) έναντι 5/20 (20%), $P=0,009$]. Μια άλλη μελέτη των Akuta et al,⁹³ στην οποία παρακολούθησαν ασθενείς γονότυπου Α, Β και C που έλαβαν λαμβουδίνη, δεν έδειξε σημαντικές διαφορές όσον αφορά στο πρότυπο των μεταλλαγών αντοχής. Ωστόσο, σε διάστημα 2 ετών θεραπείας με λαμβουδίνη, συχνότερα εμφανίζονταν αντοχή σε ασθενείς με τον ανασυνδυασμένο γονότυπο Βa παρά με τον Βj [3/4 (75%) έναντι 1/14 (7%), $P<0,05$].

Όσον αφορά στην αδεφοβίρη, δύο μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση γονότυπου και ανταπόκρισης στη θεραπεία. Στη μελέτη των Westland et al⁹⁴ δεν βρέθηκε σχέση μεταξύ γονότυπου και μείωσης του HBV-DNA ή

ρυθμού ορομετατροπής του ΗΒεΑg. Αντιθέτως, οι Fung et al⁹⁵ έδειξαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης αντοχής στην αδεφοβίρη σε ασθενείς γονότυπου D: 4 από τους 6 ασθενείς που εμφάνισαν αντοχή στην αδεφοβίρη ήταν γονότυπου D, ενώ από τους 18 ασθενείς που δεν εμφάνισαν αντοχή στην αδεφοβίρη, μόλις 2 ασθενείς ήταν γονότυπου D (P=0,02).

Τέλος, οι μελέτες που έχουν γίνει με την εντεκαβίρη δεν έδειξαν σαφή συσχέτιση μεταξύ γονότυπου και ανταπόκρισης στη θεραπεία.⁹⁶

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, υφίστανται σημαντικές διαφορές όσον αφορά στα βιολογικά και τα κλινικά χαρακτηριστικά

μεταξύ των διαφόρων γονοτύπων του ΗΒV. Ο προσδιορισμός του γονότυπου ΗΒV σε πλήρους μήκους αλληλουχίες και σε ασθενείς με χρόνια ΗΒV-λοίμωξη θα βοηθήσει σημαντικά στη διερεύνηση της παθογένειας της νόσου καθώς και στο σχεδιασμό στρατηγικών πρόληψης και θεραπείας. Οι μελλοντικοί θεραπευτικοί αλγόριθμοι θα εξατομικεύονται λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες του ξενιστή (ανοσολογικοί δείκτες), παράγοντες που σχετίζονται με τον ιό (γονότυπος ΗΒV, κατάσταση ΗΒεΑg, ύπαρξη προπυρηνικών μεταλλαγών ή μεταλλαγών στο βασικό υποκινητή της πυρηνικής πρωτεΐνης) και το στάδιο της ηπατικής νόσου (χρόνια ηπατίτιδα ή κίρρωση). Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της κλινικής σημασίας των γονοτύπων, καθώς επίσης και του ρόλου των διαφόρων υποομάδων, των μικτών λοιμώξεων και του ανασυνδυασμού.

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) genotypes: from epidemiology to clinical practice

E. MAGIORKINIS, G. MAGIORKINIS, A. HATZAKIS

Department of Hygiene and Epidemiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2007, 24(6):542-556

Hepatitis B virus (HBV) is of the most common pathogens that infect human and non-human primates, and which may cause either acute or chronic infection. The uniqueness of the HBV virus lies in the fact that it possesses a partially double-stranded DNA genome and the virus life cycle contains an intermediate reverse transcription stage catalyzed by the viral reverse transcriptase. Because of this and the ability of the virus to recombine, HBV exhibits a wide range of genetic heterogeneity. The global distribution of HBV genotypes as described by molecular epidemiology shows that there is a specific geographic model which is probably associated with the models of transmission and, mainly, with the origin and the evolutionary history of the virus. As far as the scenario of zoonosis is concerned, it should be noted that HBV has been isolated from non-human primates but not from old world monkeys. Regarding the association between genotype and phenotype, other differences have been observed as far as the prevalence of mutations which are connected with important viral biological properties are concerned, such as precore mutants and basal core promoter mutants. There are also explicit indications that recombination affects the biological properties of HBV, since recombinant strains possess properties which constitute a combination of the properties of the parental strains. HBV genotypes, apart from genomic differences, also appear to differ considerably also in their biological properties. HBV genotypes may play an important role in the pathogenesis of hepatitis B, in the responses to antiretroviral therapy, such as the manifestation of hepatic cirrhosis and the evolution to hepatocellular carcinoma, and in the response to treatment with interferon.

Key words: Genotypes, Hepatitis B virus, Molecular epidemiology, Recombination, Serotypes

Βιβλιογραφία

1. GANEM D, SCHNEIDER R. Hepadnaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001:2923-2970
2. VAUDIN M, WOTSTENHOLME AJ, TSIQUAYE KN, ZUCKERMAN AJ, HARRISON TJ. The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee. *J Gen Virol* 1988, 69:1383-1389

3. GRETHE S, HECKEL JO, RIETSCHEL W, HUFERT FT. Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates. *J Virol* 2000, 74:5377–5381
4. VERSCHOOR EJ, WARREN KS, LANGENHUIJZEN S, HERIYANTO, SWAN RA, HEENEY JL. Analysis of two genomic variants of orangutan hepadnavirus and their relationship to other primate hepatitis B-like viruses. *J Gen Virol* 2001, 82:893–897
5. WARREN KS, HEENEY JL, SWAN RA, HERIYANTO, VERSCHOOR EJ. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol* 1999, 73:7860–7865
6. LANFORD RE, CHAVEZ D, RICO-HESE R, MOOTNICK A. Hepadnavirus infection in captive gibbons. *J Virol* 2000, 74:2955–2959
7. LANFORD RE, CHAVEZ D, BRASKY KM, BUMS RB, HI RICO-HESE R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:5757–5761
8. GALIBERT F, CHEN TN, MANDART E. Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: Comparison with the hepatitis B virus sequence. *J Virol* 1982, 41:51–65
9. TIOLLAS P, POURCEL C, DEJEAN A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985, 317:489–495
10. TIOLLAS P, BUENDIA MA, BRECHOT C, DEJEAN A, MICHEL MC, POURCEL C. Structure, genetic organization, and transcription of hepadnaviruses. In: Zuckerman AJ (ed) *Viral hepatitis and liver disease*. Liss AR, New York, 1988:295–300
11. TESTUT P, RENARD CA, TERRADILLOS O, VFTVFTSKI-TREPO L, TEKAIA F, DEGOTT C ET AL. A new hepadnavirus endemic in Arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* 1996, 70:4210–4219
12. ZHOU YJ. A virus possibly associated with hepatitis and hepatoma in ducks. *Shanghai Medical Journal* 1980, 3:641–644
13. MASON WS, SEAL G, SUMMERS J. Virus of Pekin ducks with structural and biochemical relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 1980, 36:829–836
14. SPRENGEL R, KALETA EF, WILL H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 1988, 62:3832–3839
15. PULT I, NATTER HJ, BRUNS M, PRASSOLOV A, SIRMA H, HOHENBERG H ET AL. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology* 2001, 289:114–128
16. PRASSOLOV A, HOHENBERG H, KALININA T, SCHNEIDER C, COVAL, KRONE O ET AL. New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J Virol* 2003, 77:1964–1976
17. GUO H, ALDRICH CE, SAPUTELLI JR, MASON WS, NEWBOLD SE. Identification and characterization of avihepadnaviruses isolated from exotic anseriformes maintained in captivity. *J Virol* 2005, 79:2729–2742
18. CHANG SF, NETTER HJ, BRUNS M, SCHNEIDER R, FROELICH K, WILL H. A new avian hepadnavirus infecting snow goose (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virus containing single stranded DNA. *Virology* 1999, 262:39–54
19. STUYVER LJ, LOCARNINI SA, LOK A, RICHMAN DD, CARMAN WF, DIENSTAG JL ET AL. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001, 33:751–757
20. BARNABAS S, HAI T, ANDRISANI OM. The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZip transcription factors. *J Biol Chem* 1997, 272:20684–20690
21. KOIK K. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology* 1995, 38:134–142
22. GANEM D, SCHNEIDER R. Hepadnaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001:2923–2970
23. Le BOUVIER G. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis* 1971, 123:671–675
24. LEVENE C, BLUMBERG BS. Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Nature* 1969, 221:195–196
25. BANCROFT WH, MUNDON FK, RUSSELL PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* 1972, 109:842–848
26. COUROUCE-PAUTY AM, PLANCON A, SOULIER JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang* 1983, 44:197–211
27. OKAMOTO H, IMAI M, MIYAKAWA Y, MAYUMI M. Site-directed mutagenesis of hepatitis B surface antigen sequence at codon 160 from arginine to lysine for conversion of subtypic determinant from r to w. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 148:500–504
28. OKAMOTO H, IMAI M, TSUDA P, TANAKA T, MIYAKAWA Y, MAYUMI M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen oi compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 1987, 61:3030–3034
29. OKAMOTO H, TSUDA F, SAKUGAWA H, SASTROSOEWIGNJO RI, IMAI M, MIYAKAWA Y ET AL. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988, 69:2575–2583
30. NORDER H, HAMMAS B, LEE SD, BILE K, COUROUCE AM, MUSH-AHWAR IK ET AL. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993, 74:1341–1348
31. BOWYER SM, VAN STADEN L, KEW MC, SIM JG. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *J Gen Virol* 1997, 78:1719–1729
32. NORDER H, COUROUCE AM, COURSAGET P, ECHEVARRIA JM, LEE SD, MUSH-AHWAR IK ET AL. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004, 47:289–309
33. MOROZOV V, PISAREVA M, GROUDININ M. Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus. *Gene* 2000, 260:55–65
34. BOWYER SM, SIM JG. Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: Footprints of recombination in certain isolates. *J Gen Virol* 2000, 81:379–392
35. ODEMUYIWA SO, MULDER MN, OYEDELE OI, OLA SO, ODAIBO GN, OLATAYE DO ET AL. Phylogenetic analysis of new hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol* 2001, 65:463–469
36. ARAUZ-RUIZ P, NORDER H, VISONA KA, MAGNIUS LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *J Infect Dis* 1997, 176:851–858

37. NAKANO T, LU L, HU X, MIZOKAMI M, ORITO E, SHAPIRO C ET AL. Characterization of hepatitis B virus genotypes among Yucpa Indians in Venezuela. *J Gen Virol* 2001, 82:359–365
38. STUYVER L, De GENDT S, VAN GEYT C, ZOULIM F, FRIED M, SCHINAZI RF ET AL. A new genotype of hepatitis B virus: Complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000, 81:67–74
39. SANCHEZ LV, MALDONADO M, BASTIDAS-RAMIREZ BE, NORDER H, PANDURO A. Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains. *J Med Virol* 2002, 68:24–32
40. LINDH M. HBV genotype G – an odd genotype of unknown origin. *J Clin Virol* 2005, 34:315–316
41. ARAUZ-RUIZ P, NORDER H, ROBERTSON BH, MAGNIUS LO. Genotype H: A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002, 83:2059–2073
42. KATO H, GISH RG, BZOWEJ N, NEWSOM M, SUGAUCHI F, TANAKA Y ET AL. Eight genotypes (A–H) of hepatitis B virus infecting patients from San Francisco and their demographic, clinical, and virological characteristics. *J Med Virol* 2004, 73:516–521
43. KOIBUCHI T, HITANI A, NAKAMURA T, NOJIRI N, NAKAJIMA K, JYUJI T ET AL. Predominance of genotype A HBV in an HBV-HIV-1 dually positive population compared with an HIV-1-negative counterpart in Japan. *J Med Virol* 2001, 64:435–440
44. TAKAHASHI K, BROTMAN B, USUDA S, MISHIRO S, PRINCE AM. Full-genome sequence analyses of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: Implications for an origin of HBV. *Virology* 2000, 267:58–64
45. HU X, MARGOLIS HS, PURCELL RH, EBERT J, ROBERTSON BH. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:1661–1664
46. STARKMAN SE, McDONALD DM, LEWIS JC, HOLMES EC, SIMMONDS P. Geographic and species association of hepatitis B virus genotypes in non-human primates. *Virology* 2003, 314:381–393
47. SALL AA, STARKMAN S, REYNES JM, LAY S, NHIM T, HUNT M ET AL. Frequent infection of *Hylobates pileatus* (pileated gibbon) with species-associated variants of hepatitis B virus in Cambodia. *J Gen Virol* 2005, 86:333–337
48. BOLLYKY PL, RAMBAUT A, HARVEY PH, HOLMES EC. Recombination between sequences of hepatitis B virus from different genotypes. *J Mol Evol* 1996, 42:97–102
49. FARES MA, HOLMES EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol* 2002, 54:807–814
50. GUTIERREZ C, DEVESA M, LOUREIRO CL, LEON G, LIPRANDI F, PUJOL FH. Molecular and serological evaluation of surface antigen negative hepatitis B virus infection in blood donors from Venezuela. *J Med Virol* 2004, 73:200–220
51. CUI C, SHI J, HUI L, XI H, ZHUOMA Q, HU G. The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J Gen Virol* 2002, 83:2773–2777
52. HANNOUN C, NORDER H, LINDH M. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J Gen Virol* 2000, 81:2267–2272
53. MAGIORKINIS E, MAGIORKINIS G, PARASKEVIS D, HATZAKIS A. Re-analysis of a human hepatitis B virus (HBV) isolate from an East African wild born Pan troglodytes schweinfurthii: Evidence for interspecies recombination between HBV infecting chimpanzee and human. *Gene* 2005, 349:165–171
54. HEERMANN KH, GERLICH WH. Surface proteins of hepatitis B viruses. In: McLachlan A (ed) *Molecular biology of the hepatitis B virus*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991:109–143
55. HADZIYANNIS SJ, VASSILOPOULOS D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001, 34:617–624
56. ZOLLNER B, PETERSEN J, PUCHHAMMER-STOCKL E, KLETZMAYR J, STERNECK M, FISCHER L ET AL. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004, 39:42–50
57. HUY TT, USHIJIMA H, QUANG VX, NGOC TT, HAYASHI S, SATA T ET AL. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol* 2004, 74:228–236
58. JARDI R, RODRIGUEZ F, BUTI M, COSTA X, VALDES A, ALLENDE H ET AL. Mutations in the basic core promoter region of hepatitis B virus. Relationship with precore variants and HBV genotypes in a Spanish population of HBV carriers. *J Hepatol* 2004, 40:507–514
59. HADZIYANNIS SJ. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: From clinical recognition to pathogenesis and treatment. *Viral Hepat Rev* 1995, 1:7–36
60. COTE PJ, KORBA BE, MILLER RH, JACOB JR, BALDWIN BH, HORNBUCKLE WE ET AL. Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 2000, 31:190–200
61. GUNTHER S, FISCHER L, PULT I, STERNECK M, WILL H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Vir Res* 1999, 52:25–137
62. LIANG TJ, HASEGAWA K, RIMON N, WANDS JR, BEN-PORATH E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 1991, 324:1705–1709
63. OMATA M, EHATA T, YOKOSUKA O, HOSODA K, OHTO M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med* 1991, 324:1699–1704
64. HADZIYANNIS SJ, VASSILOPOULOS D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001, 34:617–624
65. OKAMOTO H, YOTSUMOTO S, AKAHANE Y, YAMANAKA T, MIYAZAKI Y, SUGAIY ET AL. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 1990, 64:1298–1303
66. HUNT CM, MCGILL JM, ALLEN MI, CONDREAY LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000, 31:1037–1044
67. HILDT E, MUNZ B, SAHER G, REIFENBERG K, HOFSCHEIDER PH. The pre-S2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002, 21:525–535
68. GERNER P, SCHAFER HM, PRANGE R, PRAVITT D, WIRTH S. Functional analysis of a rare HBV deletion mutant in chronically infected children. *Pediatr Res* 2003, 53:891–897
69. SUGAUCHI F, OHNO T, ORITO E, SAKUGAWA H, ICHIDA T, KOMATSU M ET AL. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. *J Med Virol* 2003, 70:537–544

70. HUY TT, USHIJIMA H, WIN KM, LUENGROJANAKUL P, SHRESTHA PK, ZHONG ZH ET AL. High prevalence of hepatitis B virus pre-s mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol* 2003, 41:5449–5455
71. LELIE P, IP H, REESNINK H, WONG V, KUHN M. Prevention of the hepatitis B virus carrier state in infants of mothers with and low serum levels of HBV-DNA. In: Hollinger F, Lemon S, Margolis H (eds) *Viral hepatitis and liver disease*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1991:753–756
72. NGUI SL, ANDREWS NJ, UNDERHILL GS, HEPTONSTALL J, TEO CG. Failed postnatal immunoprophylaxis for hepatitis B: Characteristics of maternal hepatitis B virus at risk factors. *Clin Infect Dis* 1998, 27:100–106
73. CARMAN WF, ZANETTI AR, KARAYIANNIS P, WATERS J, MANZILLO G, TANZI E ET AL. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990, 336:325–329
74. SUGAUCHI F, ORITO E, ICHIDA T, KATO H, SAKUGAWA H, KAKUMU S ET AL. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C. *Gastroenterology* 2003, 124:925–932
75. KAO JH, CHEN PJ, LAI MY, CHEN DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000, 118:554–559
76. DING X, MIZOKAMI M, YAO G, XU B, ORITO E, UEDA R ET AL. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001, 44:43–47
77. TSUBOTA A, ARASE Y, REN F, TANAKA H, IKEDA K, KUMADA H. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype *adv*. *J Med Virol* 2001, 65:257–265
78. FUJIE H, MORIYA K, SHINTANI Y, YOTSUYANAGI H, IINO S, KOIKE K. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Gastroenterology* 2001, 120:1564–1565
79. LEE CM, CHEN CH, LU SN, TUNG HD, CHOU WJ, WANG JH ET AL. Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 2003, 38:95–101
80. SANCHEZ-TAPIAS JM, COSTA J, MAS A, BRUGUERA M, RODES J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002, 123:1848–1856
81. THAKUR V, GUPTAN RC, KAZIM SN, MALHOTRA V, SARIN SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002, 2:165–170
82. KOBAYASHI M, ARASE Y, IKEDA K, TSUBOTA A, SUZUKI Y, SAITOH S ET AL. Viral genotypes and response to interferon in patients with acute prolonged hepatitis B virus infection of adulthood in Japan. *J Med Virol* 2002, 68:522–528
83. DUONG TN, HORIIKE N, MICHITAKA K, YAN C, MIZOKAMI M, TANAKA Y ET AL. Comparison of genotypes C and D of the hepatitis B virus in Japan: A clinical and molecular biological study. *J Med Virol* 2004, 72:551–557
84. ZHANG X, ZOULIM F, HABERSETZER F, XIONG S, TREPO C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis. *J Med Virol* 1996, 48:8–16
85. KAO JH, WU NH, CHEN PJ, LAI MY, CHEN DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000, 33:998–1002
86. WAI CT, CHU CJ, HUSSAIN M, LOK AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002, 36:1425–1430
87. HOU J, SCHILLING R, JANSSEN HLA. Molecular characteristics of hepatitis B virus genotype A confer a higher response rate to interferon treatment (Abstract). *J Hepatol* 2001, 34:15
88. COOKSLEY G, MANNS M, LAU GKK, LIAW YF, MARCELLIN P, CHOW WC ET AL. Effect of genotype and other baseline factors on response to peginterferon alfa-2a (40 KD) (Pegasys) in HBeAg-positive chronic hepatitis B: Results from a large, randomized study. *J Hepatol* 2005, 42:30
89. JANSSEN HL, VAN ZONNEVELD M, SENTURK H, ZEUZEM S, AKARCA US, CAKALOGLU Y ET AL. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: A randomised trial. *Lancet* 2005, 365:123–129
90. ZOLLNER B, PETERSEN J, SCHROTER M, LAUFS R, SCHODER V, FEUCHT HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype *adv*. *Lancet* 2001, 357:934–935
91. KAO JH, LIU CJ, CHEN DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002, 36:303–304
92. CHIEN RN, YEH CT, TSAI SL, CHU CM, LIAW YF. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003, 38:1267–1273
93. AKUTA N, SUZUKI F, KOBAYASHI M, TSUBOTA A, SUZUKI Y, HOSAKA T ET AL. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol* 2003, 38:315–321
94. WESTLAND C, DELANEY WIV, YANG H, CHEN SS, MARCELLIN P, HADZIYANNIS S ET AL. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology* 2003, 125:107–116
95. FUNG SK, BOK CHAE H, FONTANA RJ, CONJEEVARAM H, MARREIRO J, OBERHELMAN K ET AL. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2006, 44:283–290
96. LURIE Y, MANNS MP, GISH RG, CHANG TT, YURDAYDIN C, LAI CL ET AL. The efficacy of entecavir is similar regardless of disease-related baseline subgroups in treatment of nucleoside-naive, HBeAg (+) and HBeAg (-) patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2005, 42(Suppl 2):184

Corresponding author:

A. Hatzakis, Department of Hygiene and Epidemiology, 75 Mikras Asias street, GR-115 27 Athens, Greece
e-mail: ahatzak@med.uoa.gr