



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**APLICABILIDADE DOS GENES PRÉ-S E S DO VÍRUS DA HEPATITE B (VHB)  
NOS ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÔMICA**

**HERMES PEDREIRA DA SILVA FILHO**

**SALVADOR – BAHIA - BRASIL**

**2005**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

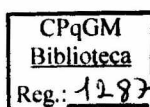
**APLICABILIDADE DOS GENES PRÉ-S E S DO VÍRUS DA HEPATITE  
B (VHB) NOS ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÔMICA**

**HERMES PEDREIRA DA SILVA FILHO**

**Orientador: MITERMAYER GALVÃO DOS REIS**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Patologia, área de concentração em Patologia Experimental.

Salvador - Bahia - Brasil  
2005



Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586a da Silva Filho, Hermes Pedreira  
Aplicabilidade dos genes Pré-S e S do vírus da Hepatite B (VHB) nos estudos de diversidade genômica [manuscrito] / por Hermes Pedreira da Silva Filho. – 2005.  
060 f. : il. ; 29 cm

Datilografado (fotocópia)  
Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina . Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.  
Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

1. Hepatite B. 2. Filogenia. 3. Diversidade genômica. 4. Mutação. I. Título.

CDU 616.36-002:575.8

211 1987

645.98-002:575.8

211 1987

MT 1/1987  
971638

APLICABILIDADE DOS GENES PRÉ-S E S DO VÍRUS DA HEPATITE B (VHB) NOS ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÔMICA

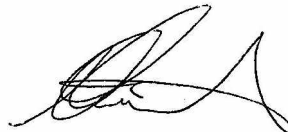
**HERMES PEDREIRA DA SILVA FILHO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

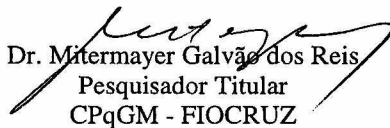
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Christian Maurice Gabriel Niel  
Pesquisador Titular  
FIOCRUZ - RJ



Dr. Luiz Carlos Jr. Alcântara  
Pesquisador Visitante  
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ

*Tudo que tenho conquistado devo ao amor que recebi de minha saudosa mãe, minha querida esposa e meus filhos, a quem devo impagáveis horas de ausência e que são a grande razão de minha existência.*

## **AGRADECIMENTOS**

A meu Orientador, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, pelo suporte intelectual e apoio em todos os aspectos de minha formação científica.

A Dr. Lee Riley, que me proporcionou a oportunidade fantástica de um grande treinamento, abrindo meus horizontes para o mundo da pesquisa.

A Dr. Raymundo Paraná, pela grande colaboração e material fornecido para realização deste trabalho.

A Dr. Luciano Kalabric, pela disponibilidade e auxílio nos momentos de dúvidas.

Aos colegas de mestrado e de laboratório pelo companheirismo e amizade.

A todo corpo técnico do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ Pós-Graduação CPqGM/UFBA.

A Dra. Joice Neves Reis Pedreira, esposa, mãe de meus filhos, amiga, profissional invejável, minha maior incentivadora e fonte de inspiração.

Ao meu querido pai e meu amado irmão Wilde.

# SUMÁRIO

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

## RESUMO

## ABSTRACT

I.	INTRODUÇÃO .....	1
II.	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1	Aspectos gerais da hepatite pelo Vírus B .....	4
2.2	Estrutura do Vírus da hepatite B.....	5
2.3	Ciclo vital do VHB e interação com o hospedeiro.....	8
2.4	Subtipos e Genótipos do VHB .....	9
2.5	Epidemiologia.....	12
2.6	Patogênese .....	14
2.7	Mutações do VHB e Consequências Clínicas .....	16
III.	OBJETIVOS .....	19
3.1	Geral.....	19
3.2	Específicos .....	19
IV.	RACIONAL E RELEVÂNCIA .....	20
V.	RESULTADOS.....	24
	ARTIGO.....	25 - 47
VI.	DISCUSSÃO.....	48
VII.	CONCLUSÕES .....	53
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
IX.	ANEXOS.....	61

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**Figura I:** Estrutura do genoma do VHB. Adaptado de Zuckerman et al, *Antiviral Research*; 2003.

**Figura II.** Topologia proposta da proteína S do envelope. Adaptado de Khan et al, *Journal of Virology*, 2004.

**Figura III:** Zonas de endemicidade da infecção crônica pelo VHB. Fonte: WHO; 2003.

**Tabela I:** Distribuição geográfica dos genótipos do VHB e subtipos de AgHBs



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AA</b>	aminoácido (P, prolina; R, arginina; S, serina; T, treonina; L, leucina; G, glicina; E, glutamina; Y, tirosina)
<b>AgHBs</b>	antígeno de superfície do vírus da hepatite B
<b>AgHBe</b>	antígeno "e" do vírus da hepatite B
<b>ALT</b>	alanina aminotransferase
<b>AST</b>	aspartato aminotransferase
<b>Anti-HBc</b>	anticorpo contra o antígeno do centro do vírus da hepatite B
<b>Anti-HBs</b>	anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
<b>Anti-HBe</b>	anticorpo contra o antígeno do envelope do vírus da hepatite B
<b>Anti-VHC</b>	anticorpo contra o vírus da hepatite C
<b>DNA-VHB</b>	ácido desoxirribonucléico do vírus da hepatite B
<b>ELISA</b>	ensaio imunoenzimático
<b>ELISA I,II,III</b>	ensaio imunoenzimático de 1ª, 2ª e 3ª geração
<b>HCC</b>	carcinoma hepatocelular
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>VHB</b>	Vírus da hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da hepatite C

## RESUMO

O estudo da diversidade genômica e do perfil molecular dos genes pré-S e S em isolados do VHB foi realizado com a utilização de técnicas da PCR (Polymerase chain reaction) e sequenciamento de DNA. Para genotipagem e análises filogenéticas utilizamos 40 amostras do norte e nordeste do Brasil, selecionadas aleatoriamente de pacientes portadores do VHB: 28 pacientes positivos para o AgHBe, na fase aguda da infecção e provenientes de Salvador-BA; 12 pacientes positivos para o AgHBs, na fase crônica da infecção e provenientes de Rio Branco-AC. O DNA do VHB foi detectado por *Nested-PCR* utilizando-se *primers* específicos para as regiões pré-S e S. Os produtos amplificados foram seqüenciados e suas seqüências foram analisadas utilizando os programas Phred/phrap e ABI Prism SEQSCAPE (Applied Biosystems). O alinhamento foi realizado pelo programa ClustalX (v.1.83) e análises filogenéticas foram realizadas pelos programas Mega3 e PAUP. Das 40 amostras oriundas da região norte e nordeste do Brasil, 57,5% (23/40) foram detectáveis por PCR e seqüenciadas. Das amostras provenientes do norte do Brasil verificamos uma diversidade genotípica; com a identificação dos genótipos A (55,6%), D (22,2%) e F (22,2%). Foi demonstrado, também, que na região nordeste, na qual temos poucos estudos dos aspectos genômicos do VHB, a presença do genótipo A (85,7%) e F (14,3%). No estudo destas amostras foram encontrados os seguintes sítios de mutações na região S do vírus: P49R, S61L, I86T e L109P, estando esta última na segunda alça imunodominante da proteína S (small protein) do envelope viral. Foram identificadas, também, mutações na região pré-S: G02E, Y129H, A79L, e a mutação S85P no elemento regulatório da região promotora do gene S (AgHBs); A mudança do nucleotídeo ocorreu sempre na primeira ou segunda posição do códon, reforçando a hipótese de seleção positiva. Estes resultados corroboram com estudos de mutações nas regiões pré-S/S do VHB e evidenciam a necessidade de se estabelecer uma vigilância molecular com o intuito de identificar a prevalência de mutações nas diversas regiões brasileiras, buscando relacioná-las aos genótipos circulantes diferentes formas de evolução da doença e impacto da vacina. A detecção de mutantes do AgHBs pode, ainda, ser extremamente útil para testes diagnósticos do VHB em doadores de sangue e órgãos.

## ABSTRACT

The study of genomic diversity of the Hepatitis B Virus (HBV) and the molecular profile of the genes pre-S and S was done with PCR techniques (Polymerase Chain Reaction) and DNA sequencing, in isolated individual carriers of the virus. For phylogenetic analyses and genotyping, we used samples from the North and Northeast of Brazil, randomly selecting 40 sera samples from carriers of HBV; 28 positive HBeAg, patients with acute infection, from Salvador-BA and 12 positive HBsAg, in chronic phase, from Rio Branco-AC. The HBV-DNA was detected by *Nested-PCR* using specific primers for the pre-S and S regions. The amplified products were sequenced, and were analyzed with the program Phred/phrap and the ABI Prism SEQSCAPE *Software* versão 2,1 (Applied Biosystems). Alignment was performed by ClustalX (v.1.83) program and phylogenetic analysis was done with the programs Mega3 and PAUP. From the 40 samples from the Northeast and Northeastern regions of Brazil, 57, 5% (23/40) were detectable by PCR and were sequenced. From the samples from the North of Brazil, we found some genotypic diversity, and identified the genotypes A (55, 6%), D (22, 2%) and F (22, 2%). We also show that in the Northeastern region, where there are few studies about the genomic aspects of HBV, that we have both genotypes A (85, 7%) and F (14, 3%). In these populations we found the following sites of mutations on the S region of the virus: P49R, S61L, I86T and L109P. The final mutation site above is the last one on the second immune-dominant loop of the viral envelope protein. Mutations were also identified on the pre-S region: G02E, Y129H, A79L, and S85P on the region provider of the gene S (HBsAg). All nucleotide changes had occurred in to first and second codon position, reinforcing the positive selection pressure hypothesis. These findings corroborate with mutations studies about HBV pre-S/S regions and highlight the need for surveillance programs to address questions as such prevalence of mutations related to specific genotypes, clinical outcome and vaccine impact in same Brazilians regions. The detection of HBsAg could be a useful tool for HBV screening tests in blood donors and organ donors

## I. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) constitui um significativo problema de saúde pública mundial, visto que, aproximadamente, 2 bilhões de pessoas em todo o mundo já foram infectadas e 350 milhões desenvolveram infecção crônica (WHO, 2004). Há consideráveis variações entre os isolados virais e grande diversidade dos genótipos e sorotipos circulantes (NORDER *et al.*, 1992) e estes fatores só contribuem para o agravamento deste problema. A utilização da transcrição reversa para replicação viral do VHB, utilizando o RNA intermediário, propicia a emergência dessas mutações, que algumas vezes conferem vantagens ao vírus, permitindo a permanência de cepas mutantes. Outros fatores como a resposta imune do hospedeiro, o uso de drogas antivirais e vacinação podem promover mutações que influenciarão na resposta terapêutica, progressão da doença, nos testes de detecção, na resposta imune, celular e humoral ou induzida por vacinação (TORRE & NAOUMOV, 1998; FRANCOIS *et al.*, 2001). Em consequência, as variações nas manifestações clínicas da infecção pelo VHB podem estar associadas tanto a fatores externos, fatores do hospedeiro, quanto à mutações no genoma viral.

A presença de uma população heterogênea no Brasil com características multiraciais e a variedade dos genótipos do VHB circulantes aponta inúmeras variáveis, tais como a presença de cepas mutantes que influenciam na evolução da doença hepática. Dados epidemiológicos disponíveis demonstram diferentes níveis de endemicidade, que varia de baixa prevalência do AgHBs menor que 2% na região sul; média endemicidade (prevalência do AgHBs entre 2% e 7%) no sudoeste, nordeste e centro-oeste; e alta endemicidade (prevalência do AgHBs >7%) na região

Amazônica e nos estados do Espírito Santo e oeste de Santa Catarina (FUNASA, 2002). Mas, poucos dados sobre a caracterização genotípica do vírus estão disponíveis em todas as regiões do Brasil, especialmente no norte e nordeste. Informações sobre a diversidade genética do VHB são de grande valor para se determinar fatores de risco associados a disseminação do vírus e auxiliar na adoção de medidas de prevenção e terapêutica.

A utilização de técnicas de biologia molecular tem demonstrado que há vírus mutantes com potencial replicativo alto, capazes de escapar do reconhecimento imunológico ou resistentes a drogas antivirais (TORRE & NAOUMOV, 1998), muitas destas mutações são associadas à infecção crônica e, finalmente, à pacientes com HCC (Carcinoma Hepatocelular) (TAI *et al.*, 2002). A região pré-S/S do genoma codifica os três antígenos virais de superfície: uma proteína "S" de 24-KD (conhecida por AgHBs ou Small protein) e muito abundante; uma proteína "M" (pré-S2 ou middle); e uma proteína "L" (pré-S1 ou large), onde encontramos os principais epítomos de superfície, incluindo o determinante "a" determinante antigênico para a vacina. Desde que o AgHBs é codificado pelo gene S e as bases moleculares para heterogeneidade sorológica são definidas por ele, é possível determinar os sorotipos pelo sequenciamento desta região (NORDER *et al.*, 1992). Além do mais, a genotipagem do VHB pelo sequenciamento de parte da região S mostra-se eficiente e com resultados consistentes comparados com aqueles feitos pelo sequenciamento do genoma completo (OKAMOTO *et al.*, 1988; MAGNIUS & NORDER, 1995). Como a região pré-S1/S2 (pré-S) tem a maior variabilidade genética das quatro ORFs, entre os isolados do VHB de genótipos distintos (BOWYER & SIM, 2000), genótipos do VHB podem influenciar mutações na região pré-S (SUGAUCHI *et al.*, 2003).

Assim, a caracterização genotípica e filogenética é muito importante para identificação de polimorfismos genótipo-relacionados, epidemiologia e patogênese das infecções hepáticas causadas pelo VHB. Além disso, estas informações podem corroborar para as pesquisas de fatores genéticos do vírus responsáveis pela falha na profilaxia ativa, passiva e vias de disseminação do VHB. Desta forma, a utilização de técnicas como a reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de DNA constituem ferramentas indispensáveis para a amplificação e estudo das regiões pré-S e S do vírus.

## II. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais da hepatite pelo Vírus da Hepatite B

Entre os vírus hepatotrópicos de transmissão parenteral, o vírus da hepatite B é o mais conhecido e um dos mais estudados. O VHB pode permanecer incubado de 30 a 180 dias, podendo ser transmitido através de soluções de continuidade em mucosa e pele, relações sexuais, exposição cutânea (parenteral) a agulhas ou outros instrumentos contaminados ( por exemplo: durante a realização de tatuagens e perfuração da orelha); transfusão sanguínea e de derivados, quando os mesmos não forem realizados seguindo todos os procedimentos recomendados; uso de drogas injetáveis, procedimentos odontológicos, cirúrgicos e de hemodiálise; transmissão perinatal (de mães AgHBs positiva para o filho) e contatos domiciliares (MILNE *et al.*, 1985; AYOOLA, 1988). Outros líquidos orgânicos como sêmem, saliva e secreção vaginal, também, podem conter o vírus e, portanto, serem infectantes (SHAPIRO, 1994).

A pessoa infectada se torna um transmissor em um período de 2 a 3 semanas antes do início dos primeiros sintomas e continua assim durante a fase aguda da doença e no estado de portador crônico, o qual pode persistir por anos ou pelo resto da vida. O paciente passa a ser considerado portador crônico quando tem a persistência do AgHBs no sangue por mais de 6 meses (LOK & MCMAHON, 2004).

O VHB está associado com um quadro de manifestações clínicas de hepatite aguda auto-limitante até uma forma fulminante com insuficiência hepática. A infecção crônica ocorre em 90% das crianças infectadas no nascimento, 25-50% das crianças infectadas entre 1 a 5 anos de idade e por volta de 2-6% em indivíduos

mais velhos ou adultos (MAHONEY, 1999). Indivíduos que desenvolvem infecção crônica tem alto risco de evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular.

## 2.2 Estrutura do Vírus da hepatite B

O VHB é um vírus DNA, da família *Hepadnaviridae* e sua replicação o aproxima filogeneticamente dos retrovírus, replicando-se mediante transcrição reversa, com a utilização de um RNA tutor para síntese de seu DNA complementar, circular incompleto. Neste grupo também estão incluídos vírus hepatotrópicos que infectam certos animais silvestres (pato de Pequim, esquilo etc.). A partícula viral completa, denominada inicialmente de partícula de Dane, tem uma estrutura complexa, sendo um duplo envoltório parcial com 3.2Kb aproximadamente (GANEM & VARMUS, 1987).

O genoma do VHB, representado na **figura I**, tem quatro ORFs (do inglês, *open reading frame*); ORF1, do gene P (polimerase) que codifica a DNA polimerase e transcriptase reversa, ORF2 contendo os genes de superfície (pré-S1, pré-S2 e S) que codificam a proteína do envelope, formada por proteínas antigênicas denominadas de antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHBs); ORF3, contendo os genes pré-core/core (pré-c/c) que codificam o AgHBe e a proteína do Core; e na ORF4 o gene X que codifica uma proteína de significância ainda desconhecida (GANEM & VARMUS, 1987).

O genoma do VHB contém cinco promotores, todos sobre a mesma fita de DNA (GANEM & VARMUS, 1987); dois promotores elevam a transcrição que codificam diversas formas das proteínas do envelope. O envelope é composto de três formas do antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs): a proteína grande do



envelope ( LHBsAg, “*large*” codificada pelo gene pré-S1/S2/S) , média ( MHBsAg, “*middle*” codificada pelo gene pré-S2/S) e pequena (SHBsAg, “*small*” codificada pelo gene S) (TIOLLAIS *et al.*, 1985). A região pré-S contém um elemento regulatório com a sequência de nucleotídeos CCAAT, a qual controla a transcrição do gene do envelope (LU *et al.*, 1995); seus produtos estão relacionados à ligação do VHB na superfície dos hepatócitos na fase inicial da infecção. Além do seu papel estrutural e funcional, a região pré-S (pré-S1/S2) tem sítios de reconhecimento para células T e B (CHISARI & FERRARI, 1995).

Na estrutura topológica proposta para a proteína “LHBsAg” do envelope, com 400 aminoácidos, há uma disposição externa (sobre a superfície da partícula viral) ou interna da porção N-terminal e uma externa da C-terminal. Mas, o antígeno S (SHBsAg), uma proteína hidrofóbica composta de 226 aminoácidos é o componente predominante do envelope viral. A principal região hidrofílica do AgHBs está situada do resíduo 100 ao 160 na proteína pequena do envelope “SHBsAg” ou do 275 ao 335 na “LHBsAg” (CHEN & OON, 1999). Os resíduos situados entre as posições dos aminoácidos de 29 a 80 na “SHBsAg” formam a principal alça citoplasmática e conseqüentemente interagem com partículas do núcleo, enquanto os resíduos localizados entre os aminoácidos 101 e 163, localizado dentro do lúmen do retículo endoplasmático, re-emergem sobre virions secretados e assim são chamados de alças imunodominantes, sendo seu principal epítipo antigênico denominado de determinante  $\alpha$  ou “a” que fica localizado entre os resíduos 124 a 147 (**Figura II**) (KHAN *et al.*, 2004).

2.3 Ciclo vital do VHB e interação com o hospedeiro

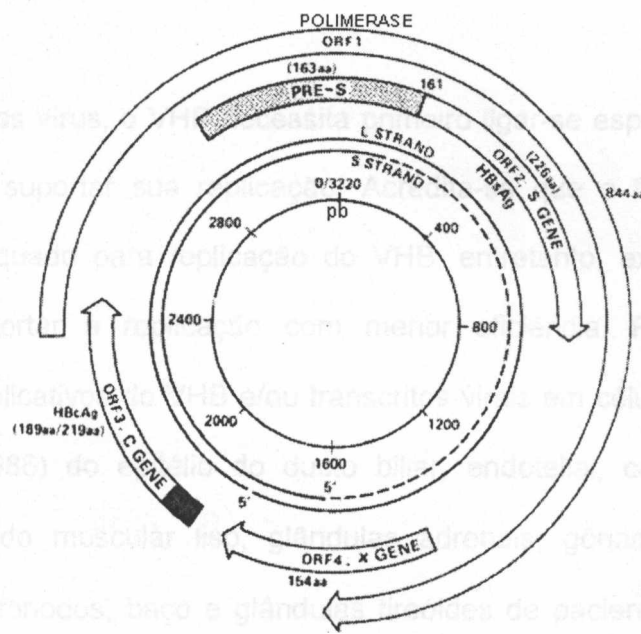


Figura I: Estrutura do genoma do VHB. Adaptado de Zuckerman et al, Antiviral Research, 2003.

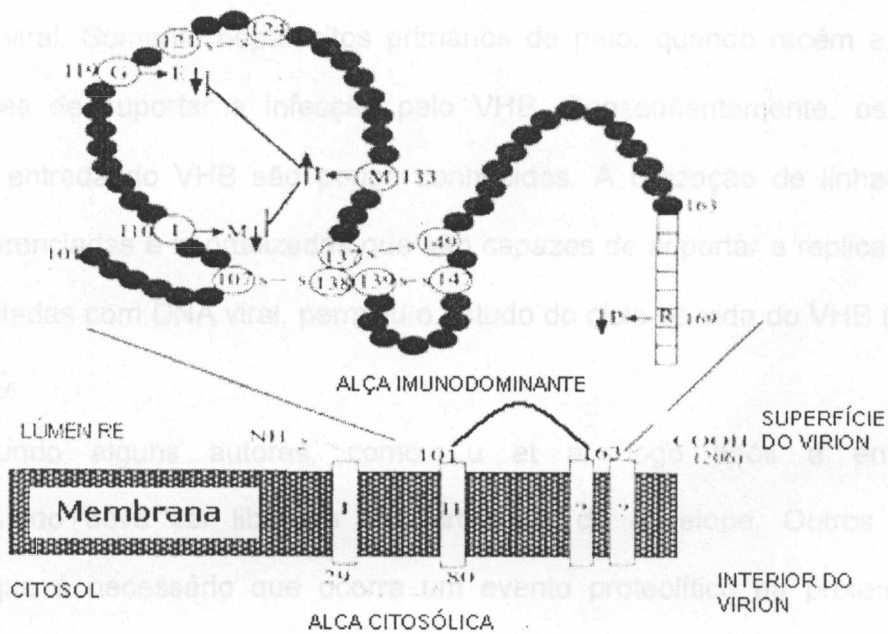


Figura II. Topologia proposta da proteína S do envelope. Adaptado de Khan et al, Journal of Virology, 2004.

### **2.3 Ciclo vital do VHB e interação com o hospedeiro**

Como outros vírus, o VHB necessita primeiro ligar-se especificamente a uma célula capaz de suportar sua replicação. Acredita-se que o fígado tenha o tipo celular mais adequado para replicação do VHB, entretanto, existem outros sítios capazes de suportar a replicação com menor eficiência. Foram encontrados intermediários replicativos do VHB e/ou transcritos virais em células mononucleares (SHEN *et al.*, 1986) do epitélio do ducto biliar, endotelial, células pancreáticas acinares, do tecido muscular liso, glândulas adrenais, gônadas, medula óssea cultivada, rins, linfonodos, baço e glândulas tireóides de pacientes com hepatite B aguda (ELFASSI *et al.*, 1984; LAURE *et al.*, 1985). A adesão viral, muitas vezes, determina a especificidade ao hospedeiro e ao tecido a um dado vírus. Entretanto, para o VHB, não há linhagens de células disponíveis capazes de suportar a replicação viral. Somente hepatócitos primários de pato, quando recém extraídos, são capazes de suportar a infecção pelo VHB. Conseqüentemente, os passos iniciais da entrada do VHB são pouco conhecidos. A utilização de linhagens de células diferenciadas e imortalizadas que são capazes de suportar a replicação viral se transfectadas com DNA viral, permitiu o estudo do ciclo de vida do VHB (CHANG *et al.*, 1987).

Segundo alguns autores, como Lu *et al.*, logo após a entrada o nucleocapsídeo deve ser liberado das proteínas do envelope. Outros estudos sugerem que é necessário que ocorra um evento proteolítico na proteína L da superfície para que a mesma exponha um domínio de fusão membranar (LU *et al.*, 1996). Entretanto, acredita-se que isto ocorra na membrana plasmática e não dentro das vesículas ácidas (KOCK *et al.*, 1996). Após a perda do envelope, o

nucleocapsídeo é transportado até a membrana nuclear, sendo então convertido em uma forma de DNA circular fechado por ligações covalentes (cccDNA).

Uma vez re-circularizado, iniciam-se as atividades promotoras e amplificadoras para produção de vários transcritos do VHB necessários para a síntese protéica e geração do RNA pré-genômico (ENDERS *et al.*, 1987). Temos uma reorganização do capsídeo, onde proteínas da polimerase ligadas como laços fechados são empacotadas pelas proteínas do core. A síntese do DNA viral e a transcrição reversa somente ocorrem após o início de formação da  cápsula (2). Acredita-se que o nucleocapsídeo completo está associado com áreas do Golgi contendo proteínas de superfície do VHB, os quais formarão vesículas, que resultarão nas partículas envelopadas de 42nm que serão secretadas pela célula via exocitose. Regiões ricas em proteínas do tipo S (small) da proteína de superfície e um mínimo de proteína do tipo M (middle) podem ser alojadas no lúmen do retículo endoplasmático e serem secretadas nas formas de esferas e filamentos de 22nm (CHISARI *et al.*, 1986).

#### **2.4 Subtipos e Genótipos do VHB**

Com propósitos epidemiológicos, dois sistemas foram desenvolvidos para classificar o VHB: um é o sorológico, baseado em reconhecimento dos anticorpos ao AgHBs determinante, e outro é baseado na diversidade da sequência do genoma do VHB. O método sorológico reconhece uma área constante, o determinante "a" (aminoácidos 124-147 do AgHBs), o qual é flanqueado pelos subdeterminantes "d" ou "y" na posição 122, e "w" ou "r" na posição 160; baseado nestes determinantes o VHB é sorotipado em 9 determinantes antigênicos de superfície : ayw1, ayw2, ayw3,

ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+ e adrq- (COUROUCE, 1976; COUROUCE-PAUTY *et al.*, 1978). Os genótipos do VHB são definidos por uma divergência de 8% ou mais do genoma completo, ou pela diversidade da região do gene S em mais de 4,1% (OKAMOTO *et al.*, 1988; NORDER *et al.*, 1994). Até o momento temos oito genótipos nomeados por letras de A a H identificados (KIDD-LJUNGGREN, 1996; STUYVER *et al.*, 2000; ARAUZ-RUIZ *et al.*, 2002). A heterogeneidade genética tem mostrado ser um importante elemento na patogênese viral (CARMAN *et al.*, 1989; BONINO *et al.*, 1991).

Estudos recentes, baseados em análises de regiões com variabilidade genotípica-dependente (pré-S/S, pré-core e core) sugerem uma distribuição geográfica característica. O genótipo A é largamente distribuído no norte da Europa, América do Norte e África Central; genótipos B e C são encontrados na Ásia Oriental e extremo Oriente; genótipo E é encontrado na maior parte da África e o F em populações indígenas das Américas (NORDER *et al.*, 1994; KIDD-LJUNGGREN, 1996), enquanto o genótipo D é encontrado em toda parte do mundo. Recentemente o genótipo G foi encontrado em amostras de pacientes infectados na França e Estados Unidos (STUYVER *et al.*, 2000) e o genótipo H na América Central (ARAUZ-RUIZ *et al.*, 2002) **Tabela I.**

Genótipos do VHB	AgHBs	Distribuição geográfica
A	Adw2	Europa, América do Norte, África e América do Sul
	Ayw1	África
B	Adw2	Extremo Oriente
	Ayw1	Extremo Oriente
C	Adrq-	Pacífico
	Adr/ayr	Extremo Oriente
	Adw	Japão e Indonésia
	adr	Pacífico e Extremo Oriente
D	Ayw4	Estados Unidos
	Ayw2/ayw3	Mundial
E	Ayw4	África
F	Adw2	América do Sul
	Adw4	Polinésia, Alasca, América Central e do Sul
	Ayw4	América do Sul
G	Adw2	Estados Unidos e França
H	Adw4/ayw4	América Central

**Tabela I. Distribuição geográfica dos genótipos do VHB e subtipos de AgHBs**

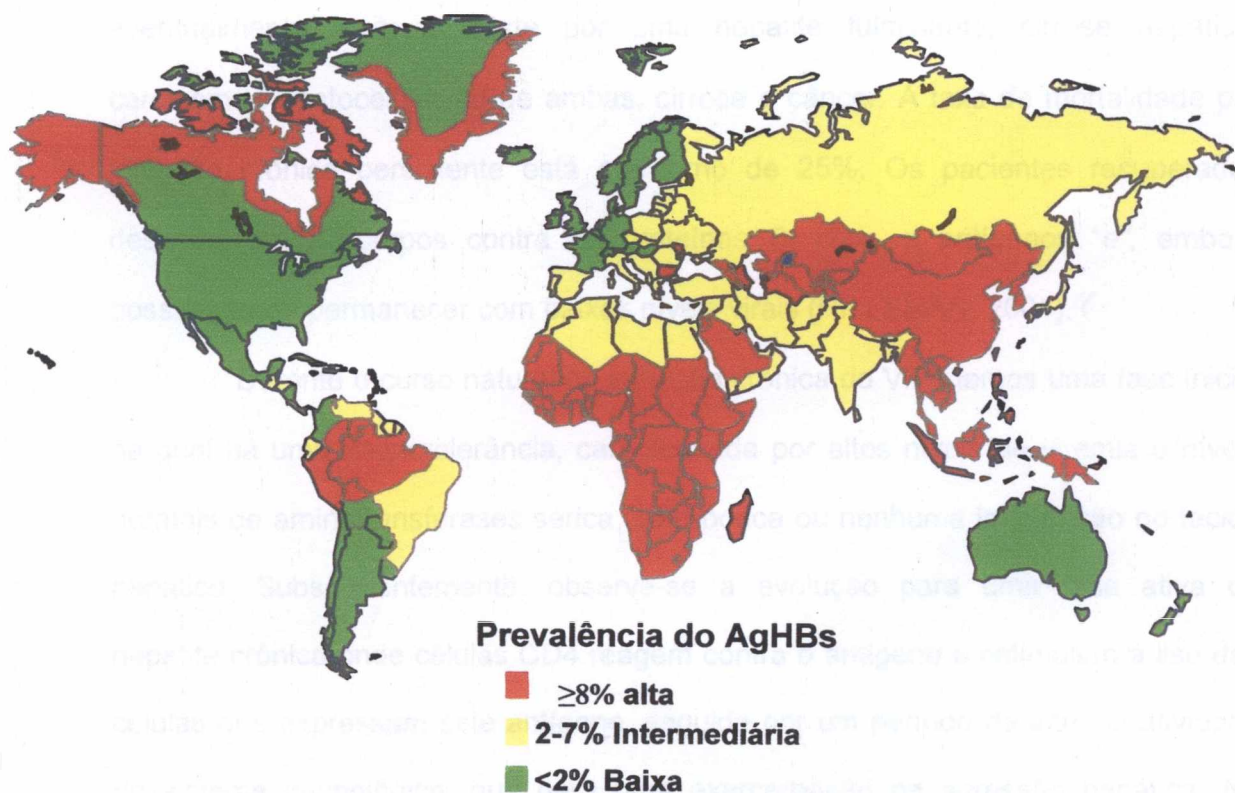
## 2.5 Epidemiologia

A hepatite B é uma das principais doenças que afetam o homem e um sério problema de saúde pública mundial. Dos vírus que causam a hepatite crônica, o VHB é o único que possui vacina desde 1982. Estima-se que 2 bilhões de pessoas em todo o mundo já foram infectadas com o VHB e mais de 350 milhões desenvolveram infecção crônica durante suas vidas. Estas pessoas infectadas, cronicamente, possuem alto risco para o desenvolvimento de cirrose e câncer hepatocelular, doenças que levam a morte em torno de 1 milhão de pessoas a cada ano (WHO, 2004).

A endemicidade da infecção pelo VHB é considerada alta onde a prevalência do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (AgHbs) é  $> 7\%$ , ou onde 60% ou mais da população têm evidência sorológica de infecção prévia. Nesta condição encontram-se países tropicais (África Sub-sahariana, parte da América do Sul, Sudoeste da Ásia, China, partes do Oriente Médio e Ilhas do Pacífico) onde a transmissão vertical e, também, durante a infância são comuns (MAHONEY, 1999). Áreas de endemicidades moderadas tem uma prevalência do AgHbs de 2% a 7% e uma prevalência de infecção de 20 a 60%. Nesta situação encontram-se a Europa Oriental e Mediterrânea, parte da América do Sul, Oriente Médio e Rússia (**Figura III**). Regiões como: América do Norte, Europa Ocidental e Austrália têm uma prevalência do AgHbs menor que 2% e menos do que 10% de infectados previamente (MAHONEY, 1999).

No Brasil, estima-se que existam dois milhões de portadores crônicos da hepatite B, e é importante ressaltar que, de modo geral, a taxa de letalidade dos

pacientes hospitalizados é de 0,8% a 2% com uma taxa de mortalidade de 0,6 por 100.000 habitantes (FUNASA, 2002). Desde 1994, o Brasil utiliza na rotina do Programa Nacional de Imunizações uma vacina DNA-recombinante contra o vírus da hepatite B. Esta vacina é aplicada, universalmente, na população infantil com menos de um ano de idade, e nos locais com maior prevalência da infecção, isto é, estados que compõem a Amazônia Ocidental, Espírito Santo, a região ocidental de Santa Catarina e Paraná nos indivíduos menores de 15 anos de idade. Também estão sendo vacinados doadores regulares de sangue e grupos de risco como: hemodialisados, politransfundidos, hemofílicos, talassêmicos, profissionais de saúde, populações indígena, indivíduos das forças armadas, presidiários e profissionais do sexo (FUNASA, 2002).



**Figura III:** Zonas de endemicidade da infecção crônica pelo VHB. Fonte: WHO 2003



## 2.6 Patogênese

A hepatite causada pelo VHB é uma doença enigmática, com necessidade de mais estudos, pois o vírus não é citopatogênico. O maior dano causado ao hospedeiro é devido aos efeitos adversos da resposta de seu sistema imune direcionado contra as células parenquimais do fígado infectado. A maioria das infecções pelo VHB resolvem-se espontaneamente, especialmente quando nos referimos a pacientes que apresentam uma forte resposta imunológica inicial. Entretanto, uma porção das pessoas infectadas responderão pobremente e poderão desenvolver infecções persistentes que poderão se curar lentamente ou não. A doença crônica poderá ser caracterizada pela remissão e exacerbação, que pode eventualmente levar a morte por uma hepatite fulminante, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular ou de ambas, cirrose e câncer. A taxa de mortalidade por infecção crônica persistente está em torno de 25%. Os pacientes recuperados desenvolvem anticorpos contra as proteínas S, core, e antígenos "e", embora possam ainda permanecer com baixos níveis virais (HILLEMANN, 2001).

Durante o curso natural da infecção crônica do VHB temos uma fase inicial na qual há uma imunotolerância, caracterizada por altos níveis de viremia e níveis normais de aminotransferases sérica, com pouca ou nenhuma inflamação no tecido hepático. Subsequentemente, observa-se a evolução para uma fase ativa da hepatite crônica onde células CD4 reagem contra o antígeno e estimulam a lise das células que expressam este antígeno, seguida por um período de intensa atividade do sistema imunológico, que gera uma exacerbação da agressão hepática. No momento em que o sistema imunológico se impõe, há uma soro-conversão

AgHBe/anti-HBe cessando a replicação viral. Na fase ativa a resposta imunológica celular aos hepatócitos infectados com VHB, primariamente contribui para danos hepatocelulares, mas posteriormente é responsável pela eliminação viral (LEE, 1997).

A resposta imune celular contra o VHB é, também, importante na patogênese do vírus bem como no desenvolvimento da doença crônica do fígado e sua severidade. A resposta imune celular ao VHB é forte e multiespecífica no hospedeiro infectado agudamente, e estes linfócitos T tipicamente secretam citocinas antivirais tipo Th1 tais como interferon alfa e fator de necrose tumoral alfa sob estímulo do vírus, contrastando com uma resposta fraca e pouco direcionada em hospedeiros infectados cronicamente. Sabe-se que alguns indivíduos infectados, cronicamente, eliminam o vírus espontaneamente e este fenômeno muitas vezes é acompanhado do aumento da resposta por linfócitos T CD4+ e agudização da doença hepática vista pelo aumento dos níveis alanina aminotransferases (WANDS *et al.*, 1992).

Temos, então, dois tipos de efetores da resposta imune adaptativa específica: anticorpos que reduzem a carga viral e previnem a infecção de células não infectadas, células T CD8 que podem induzir destruição necro-inflamatória ou apoptótica das células infectadas pelo vírus, ou podem suprimir a replicação viral em células infectadas. Lesões necro-inflamatórias podem ser vírus-específica ou não e pode haver a participação de macrófagos, neutrófilos e células NK (*natural killer*). Muitas vezes a interação dos mecanismos imunológicos promovem a eliminação do vírus em períodos variados e com aspectos clínicos que variam de uma infecção inaparente a uma hepatite fulminante com morte ou cronicidade. (HILLEMANN, 2001). Vários mecanismos de imunopatogenicidade induzidas pelo VHB, pelos quais a

doença hepática crônica tem suas diferentes fases, permanecem por serem completamente elucidados (KAJIYA *et al.*, 2002).

## **2.7 Mutações do VHB e Consequências Clínicas**

O VHB exibe uma taxa de mutação dez vezes mais alta do que outros vírus DNA e as taxas de substituição de nucleotídeos depende do estágio da doença, pois o vírus contém enzima polimerase sem ação de edição, e erros frequentes ocorrem na cópia do RNA ou DNA como em retrovíroses e outras viroses por RNA (WEBER, 2005). Realizar medidas da taxa de mudanças de sequências do VHB é difícil pela existência de ORFs sobrepostas e ausência de sítios sinônimos na maioria das sequências codificadoras. Estas mudanças de aminoácidos nas regiões pré-core e S sofrem pressão seletiva positiva e podem ocorrer como forma de evasão imune (SIMMONDS, 2001).

Mudanças no genoma do VHB tem sido encontradas durante a infecção viral crônica. Estas mudanças incluem mutações nas regiões pré-S/S que codificam as proteínas virais do envelope e podem causar variações nos epitopos virais expressos na superfície, com implicação nos processos de neutralização viral pela resposta imune e consequente aparecimento de diferentes formas clínicas da doença (MCMAHON *et al.*, 1992).

A significância de muitas destas mutações permanecem por serem entendidas, algumas podem conferir vantagens de sobrevivência aos mutantes sobre o vírus selvagem, escapando da resposta imune, ou melhorando a replicação viral (CHISARI & FERRARI, 1995). Uma mutação no *stop codon* do *gene* do pré-

core e no promotor do gene do core podem parar ou diminuir a produção do AgHBe, respectivamente (CARMAN *et al.*, 1989; MORIYAMA *et al.*, 1996).

Desde que AgHBe pode ser expresso na membrana dos hepatócitos e podem ser alvos da resposta imune, a ausência da produção do AgHBe através de uma mutação pode levar a uma falha na ação da resposta imune (SCHLICHT *et al.*, 1991). Estudos recentes sugerem que tais mutações podem ser selecionadas durante o curso da infecção crônica por dispararem a replicação viral (HAMASAKI *et al.*, 1994; SCAGLIONI *et al.*, 1997). Mutações no gene do Core, também, podem levar a uma evasão da resposta imune, haja visto que AgHBc é o maior alvo das células T citotóxicas nos hepatócitos infectados pelo VHB. Outro fato relevante é que um *stop codon* na região do pré-core pode inibir a expressão do AgHBe e promover uma soroconversão para anti-HBe; estas cepas estão implicadas em manifestações mais graves da doença e em surtos de hepatites fulminantes (HAWKINS *et al.*, 1994).

Mutações dos nucleotídeos nos genes pré-S e S, os quais expressam diferentes proteínas de superfície, tem aumentado tanto espontaneamente quanto após tratamento por Interferon ou vacinação; e acredita-se que estas mutações estejam relacionadas a um mecanismo de escape do sistema imune (KIDD-LJUNGGREN, 1996). Muitos sítios importantes têm sido identificados na região pré-S, incluindo o promotor do principal AgHBs, epítomos para células T e B e sítio para ligação do VHB aos hepatócitos (HOWARD & ALLISON, 1995). Mutações nestas regiões podem afetar a replicação viral resultando em infecção crônica devido ao escape do vírus à vigilância imunológica (CHEN & OON, 2002). Tanto os estudos epidemiológicos quanto os experimentais tem associado a progressão da infecção crônica ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (BEASLEY *et al.*, 1981;

DODD & NATH, 1987). Variações na região pré-S tem sido identificados entre genótipos estudados como A e D (BLACKBERG & KIDD-LJUNGGREN, 2003), tendo como consequência a não expressão do antígeno de superfície. Mutantes do AgHBs podem limitar ou anular a efetividade de testes de diagnóstico pela alteração da afinidade de ligação dos anticorpos anti-HBs usados em diferentes *Kits* (TORRE & NAOUMOV, 1998) e mutações ocorrem frequentemente na região S, na qual temos o determinante "a" (aminoácidos 124-147), alvo das vacinas recombinantes disponíveis para induzir a resposta imune (WEINBERGER *et al.*, 2000). Outro fator que leva a seleção induzida de anticorpos dos mutantes do gene de superfície é a utilização da IgHB profilaticamente em pacientes transplantados por cirrose e positivos para AgHBs (MCMAHON *et al.*, 1992).

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar variações genômicas presentes em isolados do VHB provenientes de Rio Branco, AC e Salvador, BA através do estudo das regiões pré-S e S do vírus.

#### **3.2 Específicos**

- I. Realizar genotipagem do VHB através da análise filogenética de parte do gene S do VHB.
- II. Identificar os genótipos do vírus da hepatite B presentes nas cidades de Rio Branco no Acre e Salvador na Bahia.
- III. Identificar possíveis mutações nas seqüências obtidas das regiões pré-S e S

#### IV. RACIONAL E RELEVÂNCIA

O controle e prevenção da hepatite B se tornou indispensável, desde que o tratamento pode, muitas vezes, ser insatisfatório. Atualmente, o uso de vacinas tem reduzido o número de portadores e protegido contra a infecção, entretanto tem surgido novas variações do VHB que podem influenciar no comportamento viral, levando a um escape do sistema imunológico e alterando a evolução clínica do hospedeiro (MORIYAMA *et al.*, 1996).

Genótipos do VHB influenciam a evolução clínica da doença crônica do fígado e a consequência virológica da infecção persistente da hepatite B (LINDH *et al.*, 1999). Dados sobre o genótipo F são escassos, embora morte relacionada a doença hepática tenha sido mais frequentemente associada com este genótipo do que os genótipos A e D (SANCHEZ-TAPIAS *et al.*, 2002).

Enquanto a associação de fraca resposta terapêutica à certos genótipos do VHC é amplamente observada, tais associações estão somente começando com o VHB (KAO,WU *et al.*, 2000). Estudos recentes têm sugerido uma possível associação de certos genótipos do VHB com o desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (FUJIE *et al.*, 2001; KAO,CHEN *et al.*, 2000). Uma nova abordagem utilizando a genotipagem após o sequenciamento tem sido utilizada para determinar modos de transmissão do VHB (**Anexo I**), assim como para caracterização de um padrão genômico viral que possa determinar a evolução e distribuição da doença. Por esta razão, a utilização do sequenciamento de DNA passa a ser fundamental, nos permitindo não só classificar o vírus, mas também conhecê-lo mais detalhadamente no que diz respeito as vias de transmissão e distribuição geográfica.

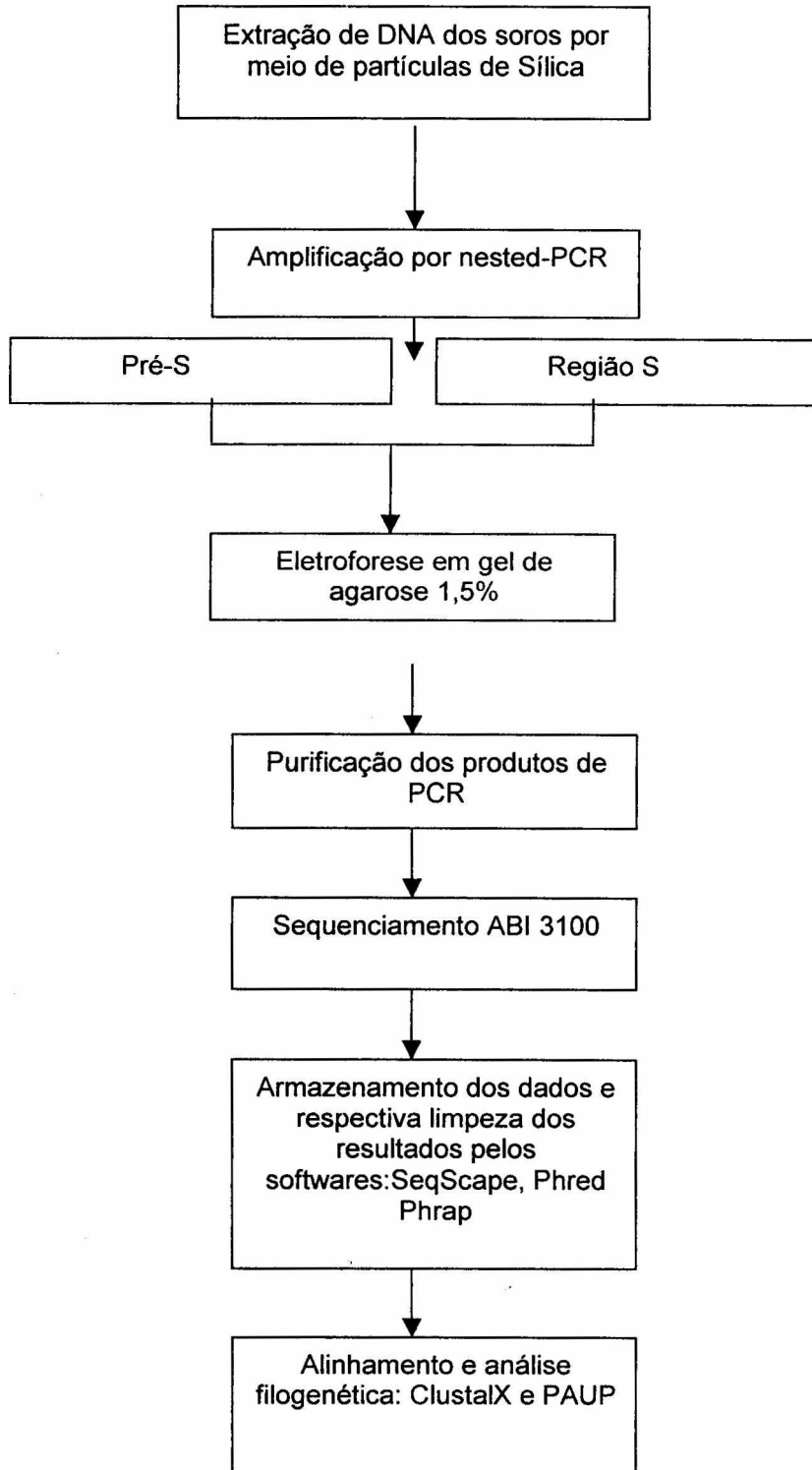
A análise filogenética através de sequências da região pré-S e S nos permite realizar um estudo mais refinado e tentar elucidar questões muito peculiares da hepatite B no Brasil, como a elevada prevalência do VHB na região Amazônica tanto quanto o pouco conhecimento sobre a prevalência no Nordeste Brasileiro e a presença de vírus mutantes. Aparentemente, o vírus circula com grande rapidez na Região Amazônica e infecta indivíduos jovens, ainda, nos primeiros anos de vida. Populações de imigrantes de regiões de baixa endemicidade soro-convertem para Anti-HBc nos primeiros anos de moradia na Amazônia (SOUTO *et al.*, 1998), indicando a rapidez de contágio nesta região. Ainda na Amazônia, a percentagem de descarte de doadores soropositivos para Anti-HBc é anormalmente elevada em comparação com outras regiões do país (MARTELLI *et al.*, 1999). O tratamento da infecção pelo VHB já é possível através da utilização de imunomodulador (Interferon-alfa) ou de outros antivirais, inibidores da transcriptase reversa como a Lamivudina (CODES *et al.*, 2002). Entretanto, o custo elevado, os efeitos colaterais e as exigências dos fatores preditivos da resposta terapêutica impedem que esse tratamento seja utilizado em larga escala (PERILLO, 1994).

A coleta de informações genômicas do VHB provenientes de pacientes infectados nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (Rio Branco/Acre e Salvador/Bahia, respectivamente) são importantes para se estabelecer características genotípicas das regiões pré-S/S com o desenvolvimento e patogênese das infecções hepáticas causadas pelo vírus. A identificação da ocorrência, a frequência de tais variações e a heterogeneidade destas regiões podem estar relacionadas com um padrão sorológico, podendo nos trazer respostas sobre possíveis escapes da profilaxia ativa e passiva e vias de disseminação do vírus. É de suma importância o estabelecimento de um programa de investigação do



VHB no interesse de estabelecer associações clínico-terapêuticas, tanto em casos agudos como crônicos. A formação de grupos de estudo e o desenvolvimento de novos projetos com o intuito de estabelecer estudos da epidemiologia molecular do VHB trará contribuições no conhecimento das manifestações da doença hepática causada pelo vírus, sua evolução e disseminação em nosso meio.

O diagrama abaixo apresenta de forma resumida as etapas realizadas:



## V. RESULTADOS

### *ARTIGO*

**Phylogenetic Analysis of Hepatitis B Virus (HBV) from North and Northeast Regions of Brazil Based in the Pres/S Gene Variability.** Silva Filho, H. P., Riley L. W., Paraná R. and Reis M.G.

(Artigo em preparação, a ser submetido ao Journal of Medical Virology).

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HEPATITIS B VIRUS (HBV) FROM NORTH  
AND NORTHEAST REGIONS OF BRAZIL BASED IN THE PRES/S GENE  
VARIABILITY**

Running Title: Phylogenetic Analysis of Hepatitis B Virus

da Silva Filho, HP<sup>1</sup>, Riley, LW<sup>2</sup>, Paraná, R<sup>3</sup> and Reis, MG<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health,  
Salvador, Brazil

<sup>2</sup>School of Public Health, University of California, Berkeley

<sup>3</sup>School of Medicine, Federal University of Bahia.

**\*Corresponding author:** mailing address - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz; Fundação  
Oswaldo Cruz/MS, Rua Waldemar Falcão, 121; Salvador, Bahia – 40295-001; Brazil.  
Telephone (55 71) 356-4320 ext 205. Fax: (55 71) 356-2155. e-mail: [miter@cpqgm.fiocruz.br](mailto:miter@cpqgm.fiocruz.br)

## ABSTRACT

In order to investigate whether any mutations within the preS/S genes could be associated with genotypes and molecular profile, the preS/S genes of 23 hepatitis B viruses (HBVs) from patients with acute and chronic infection were amplified by the polymerase chain reaction and sequenced. For these purposes we used Phred/Phrap, Consed, ClustalX, MEGA 3 and PAUP programs to analyze the partial preS/S gene sequences. We also analyzed the site corresponding to amino-acids 44-165 of the HBsAg small S-protein and 1-137 of the preS1/S2 gene. Genotypes A, D and F were found, in Northern and Northeastern regions of Brazil, with frequencies of 73%, 9% and 18%, respectively. The genotype A encoded subtypes *adw2*, genotype D encoded *ayw2* and genotype F encoded *adw4*. In these populations the following mutation sites were identified, P49R, S61L, I86T and L109P in the S gene, not within the specific "a" determinant region. Few mutations sites were found in the preS gene: G2E, Y129H in genotype A of a chronically infected patient and A79L in a patient infected with HBV genotype A, in the acute stage. The point mutation S85P, in the CCAAT-box in the S-promoter region, was found in a patient with HBV genotype F with chronic infection. These findings are relevant for molecular surveillance of HBV surface mutants, as well a useful tool for HBV screening tests in blood donors, organ donors and vaccine escape surveillance.

**Key Words:** Hepatitis B, HBV genotypes, Pre-S gene, Surface gene, Genomic variability, Brazil

## INTRODUCTION

According to the World Health Organization, more than 350 million people are chronic carriers of hepatitis B virus (HBV). Many develop chronic liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Worldwide, HBV infections account for 1 million deaths/year, most of which occur in the developing world [Lavanchy, 2004; World Health Organization, 2000]. There is growing evidence that HBV genotypes may play some role in causing different disease profiles in chronic hepatitis B (CHB) [Mayerat et al., 1999].

The natural evolutionary rate for the HBV complete genome in chronic hepatitis B is approximately  $1,4-3,2 \times 10^{-5}$  substitutions/site/year [Okamoto et al., 1987], approximately 10-fold higher than other DNA viruses [Hunt et al., 2000], moreover the S gene shows a rate of nucleotide substitutions of  $5,8 \times 10^{-5}$  substitutions/site/year [Orito et al., 1989], and may happen due genomic mutations introduced by the viral polymerase during reverse transcription, explaining maybe a number of genetically distinct genotypes, designated A–H [Arauz-Ruiz et al., 2002; Girones and Miller, 1989]. The HBV genotypes have a characteristic geographic distribution: genotype A is prevalent in the United States [Gray et al., 1997; Mangia et al., 1996], in northern and central Europe, and in South Africa [Minami et al., 1996], the genotype A has been divided recently into two subgroups, designated A-A' (genotype A excluding A') and A' which have been identified in Africa [Kramvis et al., 2002]; genotypes B and C (serotypes *adw2* and *adr/ayr*) predominate in the Far East; genotype D (serotype *ayw2* and *ayw3*) is found in the Mediterranean region, as well as in the Middle East; genotype E (serotype *ayw4*) has been reported to be mainly in west Africa [Odemuyiwa et al., 2001]; genotype F (serotype *adw4*) has been reported to mainly be in South and Central America [Arauz-Ruiz et al., 2002; Gunther et al., 1999; Magnus and Norder, 1995]; and genotype G has only recently been discovered in France [Stuyver et al.,

2000] and in the United States in patients co-infected with genotype A [Kato et al., 2002; Robertson and Margolis, 2002]. However information on the prevalence of HBV genotypes throughout Brazil is limited to South and Southeast regions, where genotypes A, B, C, D and F are found [Moraes et al., 1996; Niel et al., 1994; Sitnik et al., 2004].

The clinical and biological importance of the genotypic diversity of HBV and the implication in the generation of mutants is not fully understood. There are, however, some evidences that HBV genetic variability (from 4% to 16% among the genotypes) might be associated with different rates of transmission, resistance to interferon or progression to hepatocellular carcinoma [Odemuyiwa et al., 2001]. The virus genetic variability can be demonstrated by sequence analyzes of preS/S regions, since the small S gene encodes HBsAg, and the molecular basis for the serologic heterogeneity has been defined, it is possible to determine the serotype by sequencing this gene [Norder et al., 1992]. Also, genotyping of HBV based on limited sequencing within the S gene is feasible, with results consistent with those based on sequencing of complete genomes [Arauz-Ruiz et al., 1997].

Genotypic features and changes within or outside the coding regions of HBV viral proteins (encoded by preS1/S2 and S genes) have various clinical consequences [Bruss et al., 1996] such as: reduced synthesis of the major HBsAg, ought to result in a weaker immune response mostly found in chronic HBV infection, and removal of epitopes which may lead to the escape from immune clearance, resulting in persistent viral infection, significant events that can allow the virus to escape both active and passive prophylaxis. Here, we report the preS/S sequences of the preS1, preS2, and S genes from two distinct Brazilian regions (North and Northeast) and their phylogenetic relationship to other HBV strains, and a comparison of the S gene product deduced for these sequences with those of previously published genomes, is also presented.

## MATERIALS AND METHODS

**Samples:** Serum samples from 23 HBV carriers from two distinct Brazilian regions were used as source of HBV DNA. Their origins were: city of Rio Branco, State of Acre, Northern region of Brazil and city of Salvador, State of Bahia, Northeastern region of Brazil, respectively. Nine samples from Rio Branco with HBsAg positive for more than six months, and fourteen from Salvador with HBeAg positive were analyzed. Informed consent was obtained from all subjects to participate in this study, since they were engaged in two previous studies approved by the Ethical Committee (CONEP). Serologic determination was defined by immunologic assays ELISA to HBsAg; anti-HBc (IgG), anti-HBs to define HBV exposure and finally HBeAg and anti-HBe. All these tests were based on commercial Kits (ABBOTT, Roche Diagnostic ou Sanofi-Pasteur). The serum samples were stored at -70°C until amplification.

**Viral DNA Extraction and Amplifications of the S Region by Polymerase Chain Reaction (PCR):** Viral DNA was extracted from 100µl-200µl serum aliquots with the silica particle purification method described previously by Boom *et al* [Boom et al., 1990]. The small S gene of the HBV was chosen as target and it was amplified by PCR as two overlapping fragments using primer pairs HB1-HB2 and HB3-HB4. Then, an aliquot of the first-PCR products was used in a second PCR, employing the internal primer pairs HB5-HB6 for the HB1-HB2 amplification or HB7-HB8 for the HB3-HB4 amplification, **Table 1**. The amplification conditions was performed following a protocol described previously [Krekulova et al., 2003]; and other primers corresponding to conserved regions among the different genotypes, surrounding heterogeneous regions between them, allowing the distinction of HBV genotypes [Sitnik et al., 2004].



For the preS amplification we used a Nested-PCR with the primers PS1, PS2, PS1int and PS2int in amplification conditions described [Niel et al., 1994]. Amplified products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis in 1X Tris-borate-EDTA buffer. The HBV primers used for PCR, sequences and genome position are shown in **Table 1**.

**Purification and Sequencing:** The amplified DNA fragments were purified using the QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) and sequenced in both directions by dideoxynucleotide terminator method, with the ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Sequence assembly was done using the Phred/phrap software [Ewing and Green, 1998] in consensus with the Sequencing Analysis Version 5.1 (Applied Biosystems), DNASIS (Hitachi, San Francisco CA), Sequence Manager from Lasergene package (DNASTAR, Inc, Madison, Wi) and SeqScape Version 2.1 (Applied Biosystems).

**Phylogenetic Analysis and Assessment of Mutations:** A fragment of 371bp from the small S gene of the HBV (position 282-652nt) was used for phylogenetic analysis and also for amino-acids studies, and was translated into corresponding amino-acids (44-165 of the HBsAg small S-protein), including sequences obtained from the GenBank/EMBL database. We also performed phylogenetic analysis with a fragment of 327bp from preS region plus 371bp of the S region; totalizing a fragment with 698bp. Aiming to obtain assessment of mutations the site corresponding to amino-acids 1-137 of the preS1/S2 gene was analyzed.

A multiple sequence alignment of the examined region and the related sequences in the GenBank/EMBL database was performed with the ClustalX program [1.83] [Jeanmougin, 1998] and further edited with the Mega3 program [Molecular Evolutionary Genetics Analysis, V3.1b] [S. Kumar, 2004] and MegaAlignment from Lasergene package (DNASTAR,

Inc, Madson). Neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) trees were estimated with PAUP\* version 4.0.b 10 [Swofford, 2003]. The HKY85 substitution model including substitution rate heterogeneity with a gamma distribution was chosen as the best model for partial preS and S analysis. The NJ tree was constructed with an optimized nucleotide substitution rates matrix and  $\alpha$  shape parameter using empirical base frequencies. The reliability of the NJ trees was evaluated by analyzing 1,000 bootstrap replicates. For the ML tree reconstruction, a heuristic search with the subtree-pruning-regrafting branch swapping algorithm was performed using the NJ tree as starting tree including its optimised parameters was performed using the NJ tree as the starting tree including its optimized parameters. A likelihood ratio test was used to calculate the statistical support for the branches (expressed in *P* values) Trees were drawn with the TreeView 1.6.6 program [Glasgow University, Scotland] [Page, 1996].

### **Database sequences**

The following accession numbers of the reference sequences were used in phylogenetic and amino-acid diversity analysis: Genotype A, X70185, X51970 and X75666; A', M57663, U55220, U55221, X75669, U87745, U87740, U87852 and AF297625; genotype B, D00329; genotype C, X75656, M38636, X04615 and X75792; genotype D, X65257, X85254, M32138, X65258, X75662, X75668 and U91832; genotype E, X75657, X75664; genotype F, X69798, X75663, X75658, AF223963, X75661 and AF288627; genotype G, AF160501; and genotype H, AY090460, AY090457 and U91819.

## RESULTS

**Phylogenetic analysis of partial preS/S region:** Serum samples from each patient were tested for the presence of HBV DNA by a PCR test as described in our methodology. We genotyped 14 samples from patients with acute infection finding: 85, 7% (12 of 14) of genotype A and 14,3% (2 of 14) of genotype F; and from the 9 patients with chronic infection we found 55,6% (5 of 9) genotype A, 22,2% (2 of 9) of genotype D, and 22,2% (2 of 9) of genotype F. The HB37 isolate genotype was determined by phylogenetic analysis of the preS region only (data not showed). As shown in the phylogenetic analysis (Figure I), we found the following genotypic frequency among our samples: 73% of genotype A, 9% of genotype D and 18% of genotype F, also finding the subtypes *adw2* (genotype A), *ayw2* (genotype D) and *adw4* (genotype F) (Table II).

A phylogenetic analysis was performed with a 698bp fragment from preS/S region including 11 sequences determine in this work and an additional 24 sequences available from GenBank. In the resulting phylogenetic tree (Figure II) our samples belonging to genotype A were clustered in subgroup A'.

**PreS/S gene mutations:** Amino acid sequences of partial preS region (position 1 to 137) were deduced and arranged by genotype and clinical outcome. (Figure III). It was used knowing sequences from GenBank to try establish a pattern, chronic and acute background, which could give us information about genotype relation to a specific outcome. Few mutations sites were found: G2E and Y129H in the sample HB37, belonging to genotype A and chronic infected; A79L in the sample HB08, genotype A with acute infection; and S85P in the sample HB35, genotype F with chronic infection; except for this point mutation in the regulatory element with the nucleotide sequence of CCAAT in the preS region, the amino

## DISCUSSION

HBV genotypes influence the clinical manifestation of chronic liver diseases and virological consequence of the persistent HBV infection [Lindh et al., 1999]. Genotypes A and B are correlated with better responses to treatment than genotypes D and C [Zhang et al., 1996], while genotypes A and C are associated to the progression to chronic hepatitis or more severe diseases such as hepatocelular carcinoma, respectively [Mayerat et al., 1999]. Data about genotype F are sparing, although death related to liver disease have been related to be more frequently associated with this genotype than with genotypes A or D [Sanchez-Tapias et al., 2002].

The prevalence of HBV genotypes found in this study is similar to other observations from Brazil, whereas genotypes A, D and F have been identified [Moraes et al., 1996; Sitnik et al., 2004; Teles et al., 1999] . Although genotypes B and C have been reported in São Paulo, a Brazilian state with a higher percentage of Asian descendants[Sitnik et al., 2004], we did not find genotypes B and C in our samples, despite the fact that Japanese and Chinese colonies are present in Salvador. The high proportion of HBV strains from subgroup A' in our population may be the result of the displacement of African populations during the colonial period, when an intense slave trade was implemented from Africa to South America [Araujo et al., 2004]. The absence of the African genotype E among our samples from Bahia, a state recognized to have a higher predominance of African descendants in Brazil, supports the hypothesis of a recent introduction this HBV genotype in Africa [Norder et al., 1993; Quintero et al., 2002]. Our data regarding to genotype F is consistent to the region with Ameridian population, however we have had only 2 samples in our study from North region, where it has been considered to be representative of the HBV strains [Naumann et al., 1993]. The *adv4* subtype has been found to be predominant in Chile, Argentina and Venezuelan

Cuiva Red Indians [Arauz-Ruiz et al., 1997], regions closely to Acre, our second site of investigation. This large genetic diversity of HBVs circulating in Brazil might be explained by the diverse origin of the population, formed by colonizers from Europe and Africa, regions where genotypes A and D are common, and they miscigenated with native aborigines, carriers of genotype F strains.

Hepatitis B infection is clinically variable, ranging from an acute or self-limiting infection to a chronic infection with or without progression to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [Blackberg and Kidd-Ljunggren, 2003]. PreS region codes for immunogenic viral envelope proteins, which are important targets in viral clearance and in the prevention of infection. B and T-cell antigenic determinants have been mapped in the preS1, preS2 and S regions, whose sequences were modified by some mutations we found. The preS (S1 and S2) regions along to the amino acid position 100 to 160, exposed at the surface of the HBV particles, are highly immunogenic and are frequently under selective pressure by the immune system.

At amino acid level we did not find any substitutions at the hepatocyte receptor site (aa 21-47) [Neurath et al., 1986], however we did find few mutations points in the preS region: G2E and Y129H in the sample HB37, belonging to a patient with HBV genotype A and chronic infected. This raise questions and hypothesis that can be supported by an earlier study, showing a relative high prevalence of the preS2 variants in chronic HBV carriers [Santantonio et al., 1992]. The S85P mutation, in the CCAAT-box in the preS region, which controls transcription of the envelope gene [Lu et al., 1995], was found in the sample HB35, genotype F with chronic infection. Interestingly, there was a high similarity between the sequence of this strain and HB03 sequence, which comes from a patient who had an acute infection with a good outcome and immunologic clearance. This feature is suggestive of the weak expression

of the surface antigen gene in the mutant sample (HB35), which deserve a better investigation.

Previous studies have suggested that point mutation, deletion, or rearrangements in several genes of the HBV genome which interfere with gene expression or lead to the production of S protein modified antigenically may be responsible for the lack of HBsAg [Cabrerizo et al., 2000; Schories et al., 2000; Weinberger et al., 2000]. The genotype D represented in our samples by HB30 and HB32 sequences (chronic infected, HBsAg positive), were similar with the sequence from Italy isolate (GenBank accession number X65257) (Figure III and IV), which is HBsAg negative and developed a chronic hepatic disease. These findings raise a matter of great concern to the presence of HBV infected patients that could not be detected by routine diagnostics tests used in our clinical settings.

Regarding the S gene, we found the point mutation L109P, located within the immunodominant loop (101-163aa), in a sample genotype A with chronic disease, HB38; another mutation identified as I86T in the sample HB09 (genotype A, acute disease), none of them representing clinical relevance.

At present, the use of vaccines has reduced the number of HBV carriers and protected them from infection. However, some reports have described the emergence of novel HBV variants that can influence the viral behavior and thus alter the clinical course of the host [Schodel, 1994]. The incidence of infection with variant strains of HBV among vaccinated infants has been reported [Mahoney, 1999], furthermore HBV vaccination, anti-HBV hyper immunoglobulin (HB1g) and anti-HBs monoclonal antibody may induce or select resistant mutation strains [Chong-Jin et al., 1999].

With the sequences obtained from the S region, it was possible to perform phylogenetic and amino-acids analysis, albeit we could not correlate it to the different forms of evolution of the disease. Nevertheless, these findings highlight the need for surveillance programs to address

questions as such prevalence of mutations related to specific genotypes, clinical outcome and vaccine impact worldwide. The molecular and epidemiological monitoring of HBV surface mutants could be a useful tool for HBV screening tests in blood donors and organ donors.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Luciano Kalabric Silva, PhD., Gonçalo Moniz Research Center/Oswaldo Cruz Foundation for his helpful advice and Professor Joice Neves Reis Pedreira, PhD., Federal University of Bahia for her critical review of the manuscript.

This study was supported by Brazilian Council for Technological and Scientific Development and by the Fogarty International Program in Research and Training in Emerging Infectious Disease (Grant TW00905) of the Health National Institute in the United States of America.

We also thanks to FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia- project 3003/03) for supporting the bioinformatics and phylogenetic analysis training program.

## REFERENCES

- Araujo NM, Mello FC, Yoshida CF, Niel C, Gomes SA. 2004. High proportion of subgroup A' (genotype A) among Brazilian isolates of Hepatitis B virus. *Arch Virol* 149(7):1383-1395.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 83(Pt 8):2059-2073.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnius LO. 1997. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *J Infect Dis* 176(4):851-858.
- Blackberg J, Kidd-Ljunggren K. 2003. Mutations within the hepatitis B virus genome among chronic hepatitis B patients with hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 71(1):18-23.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3):495-503.
- Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, Wunderlich G. 1996. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* 39(1-2):23-31.
- Cabrerizo M, Bartolom inverted question marke J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. 2000. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 32(1):116-123.
- Chong-Jin O, Wei Ning C, Shiuan K, Gek Keow L. 1999. Identification of hepatitis B surface antigen variants with alterations outside the "a" determinant in immunized Singapore infants. *J Infect Dis* 179(1):259-263.
- Ewing B, Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8(3):186-194.
- Girones R, Miller RH. 1989. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* 170(2):595-597.
- Gray AH, Fang JW, Davis GL, Mizokami M, Wu PC, Williams R, Schuster SM, Lau JY. 1997. Variations of hepatitis B virus core gene sequence in Western patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 4(6):371-378.
- Gunther S, Fischer L, Pult I, Sterneck M, Will H. 1999. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 52:25-137.
- Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. 2000. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 31(5):1037-1044.
- Jeanmougin F, J. D. Thompson, M. Gouy, D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23:403-405.
- Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. 2002. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol* 76(12):6131-6137.
- Kramvis A, Weitzmann L, Owiredu WK, Kew MC. 2002. Analysis of the complete genome of subgroup A' hepatitis B virus isolates from South Africa. *J Gen Virol* 83(Pt 4):835-839.
- Krekulova L, Rehak V, da Silva Filho HP, Zavoral M, Riley LW. 2003. Genotypic distribution of hepatitis B virus in the Czech Republic: a possible association with modes of transmission and clinical outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15(11):1183-1188.



- Lavanchy D. 2004. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 11(2):97-107.
- Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. 1999. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 179(4):775-782.
- Lu CC, Chen M, Ou JH, Yen TS. 1995. Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression. *Virology* 206(2):1155-1158.
- Magnius LO, Norder H. 1995. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 38(1-2):24-34.
- Mahoney FJ. 1999. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 12(2):351-366.
- Mangia A, Chung YH, Hoofnagle JH, Birkenmeyer L, Mushahwar I, Di Bisceglie AM. 1996. Pathogenesis of chronic liver disease in patients with chronic hepatitis B virus infection without serum HBeAg. *Dig Dis Sci* 41(12):2447-2452.
- Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. 1999. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 6(4):299-304.
- Minami M, Poussin K, Kew M, Okanoue T, Brechot C, Paterlini P. 1996. Precore/core mutations of hepatitis B virus in hepatocellular carcinomas developed on noncirrhotic livers. *Gastroenterology* 111(3):691-700.
- Moraes MT, Gomes SA, Niel C. 1996. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brazil. *Arch Virol* 141(9):1767-1773.
- Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, Gerlich WH. 1993. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* 74 ( Pt 8):1627-1632.
- Neurath AR, Kent SB, Parker K, Prince AM, Strick N, Brotman B, Sproul P. 1986. Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine* 4(1):35-37.
- Niel C, Moraes MT, Gaspar AM, Yoshida CF, Gomes SA. 1994. Genetic diversity of hepatitis B virus strains isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol* 44(2):180-186.
- Norder H, Courouce AM, Magnius LO. 1992. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 73 ( Pt 12):3141-3145.
- Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnius LO. 1993. 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* 74 ( Pt 7):1341-1348.
- Odemuyiwa SO, Mulders MN, Oyedele OI, Ola SO, Odaibo GN, Olaleye DO, Muller CP. 2001. Phylogenetic analysis of new hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. *J Med Virol* 65(3):463-469.
- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. 1987. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 57(4):231-236.
- Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, Gojobori T. 1989. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(18):7059-7062.
- Page RD. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12(4):357-358.
- Quintero A, Martinez D, Alarcon De Noya B, Costagliola A, Urbina L, Gonzalez N, Liprandi F, Castro De Guerra D, Pujol FH. 2002. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Afro-Venezuelan populations. *Arch Virol* 147(9):1829-1836.

- Robertson BH, Margolis HS. 2002. Primate hepatitis B viruses - genetic diversity, geography and evolution. *Rev Med Virol* 12(3):133-141.
- S. Kumar KT, and M. Nei. 2004. MEGA [Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment]. Version 3.
- Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. 2002. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 123(6):1848-1856.
- Santantonio T, Jung MC, Schneider R, Fernholz D, Milella M, Monno L, Pastore G, Pape GR, Will H. 1992. Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology* 188(2):948-952.
- Schodel F. 1994. Emerging viral mutants in hepatitis B. *Lancet* 343(8893):355-356.
- Schories M, Peters T, Rasenack J. 2000. Isolation, characterization and biological significance of hepatitis B virus mutants from serum of a patient with immunologically negative HBV infection. *J Hepatol* 33(5):799-811.
- Sitnik R, Pinho JR, Bertolini DA, Bernardini AP, Da Silva LC, Carrilho FJ. 2004. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *J Clin Microbiol* 42(6):2455-2460.
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 81(Pt 1):67-74.
- Swofford DL. 2003. PAUP [Phylogenetic Analysis Using Parsimony]. Version 4b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Teles SA, Martins RM, Vanderborcht B, Stuyver L, Gaspar AM, Yoshida CF. 1999. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. *Artif Organs* 23(12):1074-1078.
- Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W. 2000. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol* 81(Pt 5):1165-1174.
- World Health Organization W. 2000. Hepatitis B. WHO/204 p.
- Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, Trepo C. 1996. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. *J Med Virol* 48(1):8-16.

**Table I.** Sequences of primer sets used for polymerase chain reaction to amplify PreS/S genes of Hepatitis B Virus.

Primer	Sequence (5'→3')	Nucleotide Position
PreS gene		
PS1	CCATATTCTTGGGAACAAGA	2826-2845
PS2	GGTCCCCAGTCCTCGAGAAG	124-143
PS1int	GAACAAGAGCTACAGCATGG	2832-2851
PS2int	AGAGGCAGTAGTCGGAACAG	90-109
Surface gene		
HB1	TATCTTCCTGCTGGTGGCTCC	50-70
HB2	AATACCACATCATCCATATA	736-755
HB3	CCTATGGGAGTGGG	637-650
HB4	ACTTTCCAATCAATAGG	970-986
HB5	GAACAGTAAACCCCTGCTCCG	78-97
HB6	CATCCATATAGCTGAAAGCC	726-745
HB7	CGTTTCTCTTGGCTCAGTTT	659-678
HB8	TGTACAATATGATCCTGTGG	910-929
FHBS1	GAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC	244-267
FHBS2	CGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTC	255-278
RHBS1	AAATKGCAGTAACTGAGCCA	668-691
RHBS2	GCCARGAGAAACGGRCTGAGGCC	648-671

**Table II.** Identification and Geographic Origin of 23 Samples with HBV Infection.

Isolate name	Clinical background	Origin	Genotype	Subtype	Point mutations	
					PreS (aa)	S (aa)
HB01	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB02	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB03	AH	Bahia	F	<i>adw4</i>		
HB06	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB08	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>	A79L(GCA→CTA)	
HB09	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		I86T(ATC→ACC)
HB11	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB18	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB20	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB21	AH	Bahia	F	<i>adw4</i>		P49R(CCT→CGT)
HB22	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB25	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB27	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB28	AH	Bahia	A	<i>adw2</i>		
HB30	CH	Acre	D	<i>ayw2</i>		
HB32	CH	Acre	D	<i>ayw2</i>		
HB33	CH	Acre	A	<i>adw2</i>		
HB34	CH	Acre	A	<i>adw2</i>		
HB35	CH	Acre	F	<i>adw4</i>	S85P (TCC→CCC)	
HB37	CH	Acre	A	<i>adw2</i>	G02E (GGG→GAG), Y129H (TAT→CAT)	
HB38	CH	Acre	A	<i>adw2</i>		S61L(TCA→TTA), L109P(CTA→CCA)
HB39	CH	Acre	A	<i>adw2</i>		
HB40	CH	Acre	F	<i>adw4</i>		

HBV, hepatitis B virus; S antigen; AH, acute hepatitis; CH, chronic hepatitis; aa, amino acid

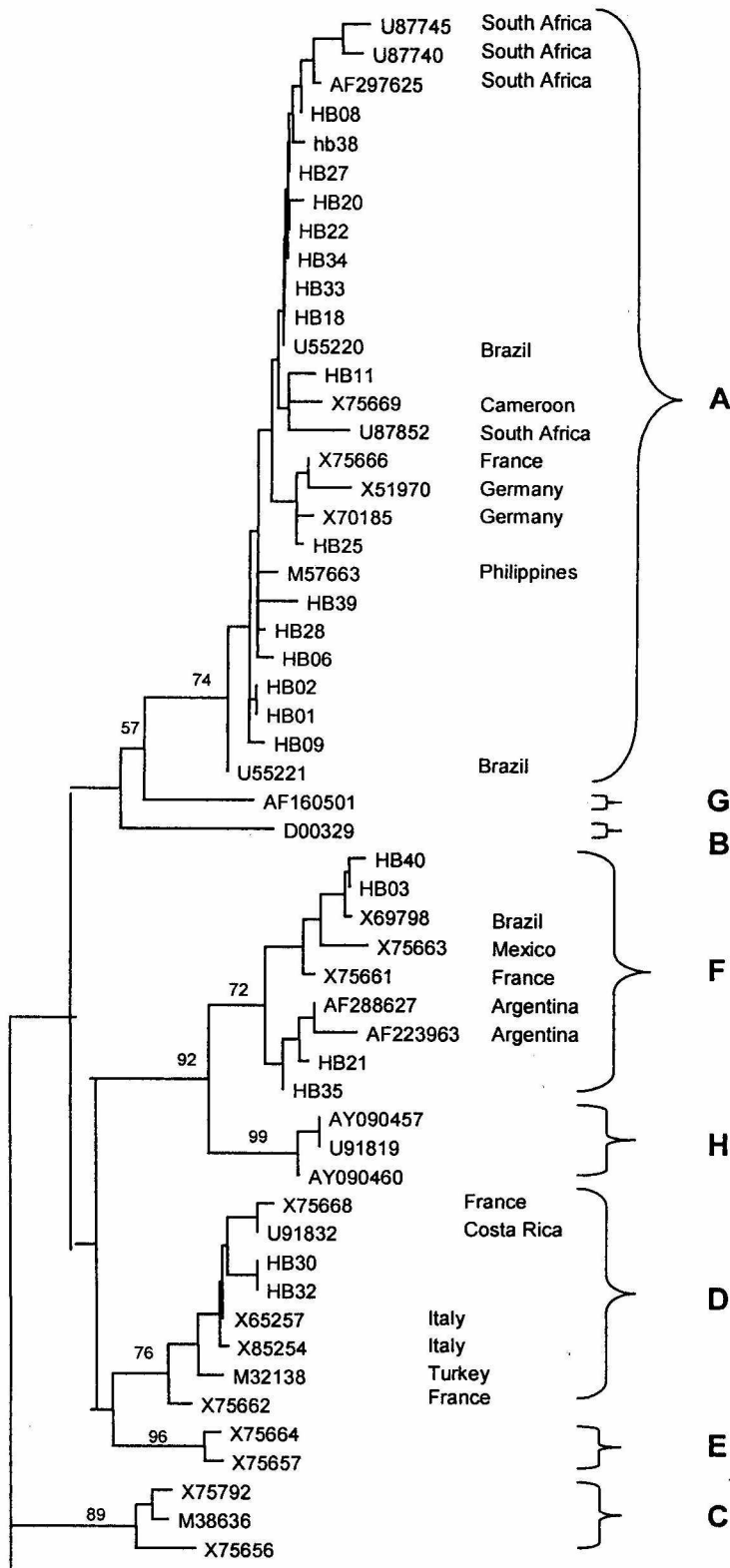
## FIGURE LEGENDS

**Figure I:** Rooted neighbor-joining tree of 54 HBV isolates based on the nucleotide sequences of the partial S region (nt. positions 282 to 652) with a bootstrap values above 50% and using 1000 bootstrap samples. The isolates named with HB are from this work. The other isolates are representative of all genotypes (A to H) and are designated by their GenBank accession number. Samples from patients with chronic disease are demonstrated in box; Outgroup NC001896 (Woolly Monkey).

**Figure II:** Rooted neighbor-joining tree of 35 HBV isolates based on the nucleotide sequences of the partial preS/S regions (fragment of 698bp) with a bootstrap values above 50% and using 1000 bootstrap samples. The isolates named with HB are from this work. The other isolates are representative of all genotypes (A to H) and are designated by their GenBank accession number. The \*\* means that the maximum-likelihood *P*-values was highly significant ( $p < 0.001$ ).

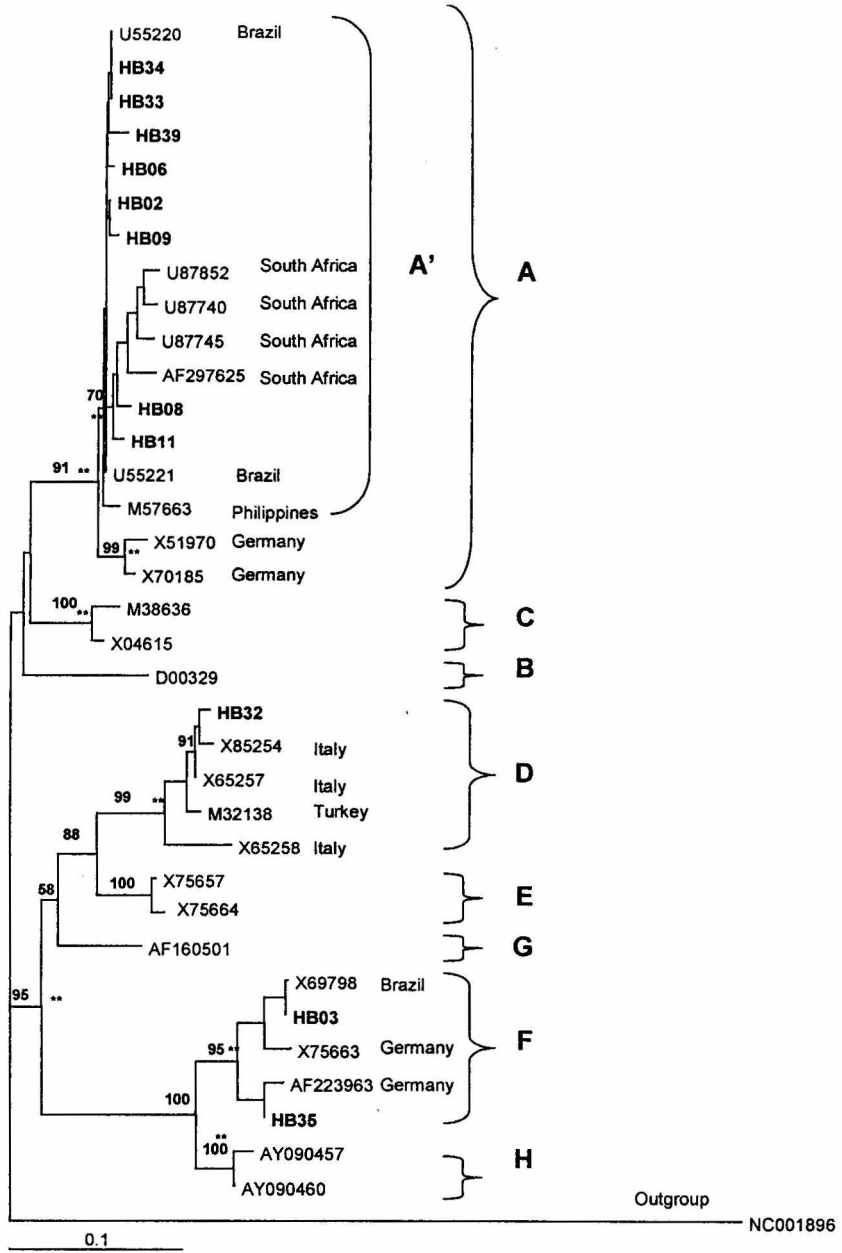
**Figure III:** Alignment of predicted amino acid sequences of envelope proteins, PreS region (aa 1-137), from 11 Brazilian HBV isolates, with chronic hepatitis (CH) and acute hepatitis (AH), and 8 GenBank sequence references. We used single amino acid letter code.

**Figure IV:** Alignment of amino-acids sequences of the partial small S gene (aa position 44-165). The first line is represented by the amino-acids consensus.



0.1

NC001896



		Hepatocyte receptor																												
		*	20	*	40	*	60	*	80	CCAAT	*	100	*	120	*															
	x65257D	:	MGCNLS	ENPLGFFPDHQIDPA	FANTANEDWD	E	PNKRD	TPDANFV	GAGAFCLG	FTEPHGGLIGW	S	PCAQGI	IQTLPAN	PPPA	STN	RQSG	RQPTLSPPI	RNTHPC	AMQ	WNSIT	FHQILQD	PFV	RGLY	FPAG	CESS	:	137			
	x65258D	:		S																							137			
CH	HB3Z	:																									137			
	x51970A	:	I	VF		V	G	N		I	E	A	C	V	P			TP	STI		A				A	A	137			
	X70185A	:	I	VF		G	N		I	E	A	C	V	PRL				T	STI						A	A	I	137		
	HB0E	:	I	VF		G	N		I	E	Q	C	V	P				A	V						A	A	137			
AH	HB02	:	I	VF		G	N		I	E	Q	C	V	P				A	V						AL	A	137			
	HB05	:	I	VF		G	N		L	E	Q	C	V	P				A	V						A	A	137			
	HB0E	:	I	VF		G	N		V	E	Q	C	V	P				A	L						A	A	137			
	HB34	:	I	VF		G	N		I	E	Q	C	V	P				A	V						A	A	137			
CH	HB35	:	I	VF		G	N		I	E	Q	C	V	P				A	V						A	A	I	137		
	HB3E	:	I	VF		G	N		I	E	Q	C	V	P				A	V						A	A	137			
	HB37	:	E	VF		G	N		I	E	Q	C	V	P				A	V						A	Q	AQ	H	137	
	M57663A	:	I	VF		G	N		I	E	Q	C	V	P				A	F						A	A	137			
	X69798F	:		VF		L	SS		T		M		V	G	P			T							P	R	K	137		
	AF223963F	:		VF		L	SS		K	K	M		V	G	P			T								P	R	K	137	
CH	HB3E	:		VF		L	SS		K	K	M		V	G	P			T								F	P	R	K	137
AH	HB0E	:		VF		L	SS		T		M		V	G	P			T									P	R	K	137
	x75663F	:		VF	I	L	SS		T		M		V	G	P			T								L	R	C	137	



	*	60	*	80	*	100	*	120	*	140	*	160
<b>Consensus</b>	GSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYRWMLRRFIIIFLLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTSTGPKCTCTTFAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSWAFAYLI											
HB22	:											
HB20	:											
HB27	:											
HB18	:											
HB33	:											
HB34	:											
hb38	:	:	L	:	:	:	:	P	:	:	:	:
HB08	:											
X75666A	:											
X51970A	:	:	R	:	:	:	:	:	:	L	:	:
X70185A	:											
HB25	:											
HB06	:											
HB28	:											
HB39	:	TT	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
M57663A	:	A	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
HB02	:											
HB01	:											
HB09	:											
HB11	:	:	:	:	T	:	:	:	:	:	:	:
X75669A	:	:	:	:	:	C	:	:	:	:	:	:
X75668D	:	TT	:	T	:	:	:	S	:	R	M	T
U91832D	:	TT	:	T	:	:	:	S	:	R	M	T
X65257D	:	TT	:	T	:	:	:	S	:	R	T	Y
HB30	:	TT	:	T	:	:	:	S	:	R	T	Y
HB32	:	TT	:	T	:	:	:	S	:	R	T	Y
X85254D	:	TT	:	T	:	:	:	S	:	R	T	Y
M32138D	:	TT	:	T	:	:	:	S	:	R	T	Y
X75662D	:	TT	:	T	:	:	:	S	:	R	T	Y
AF288627F	:	T	G	P	:	L	:	T	:	L	T	:
AF223963F	:	T	G	P	:	L	:	T	:	V	:	PL
HB21	:	G	R	:	L	:	T	:	:	L	:	T
HB35	:	T	:	L	:	T	:	:	:	L	:	T
HB40	:	L	G	P	:	L	:	T	:	L	:	T
HB03	:	L	G	P	:	L	:	T	:	L	:	T
X69798F	:	L	G	P	:	L	:	T	:	L	:	T
X75661F	:	L	G	P	:	L	:	T	:	L	:	T

## VI. DISCUSSÃO

A hepatite B ainda constitui-se um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, apesar da vacina está disponível em muitos destes países. O Brasil, por ter regiões de alta e média endemicidade utiliza na rotina do Programa Nacional de Imunizações uma vacina DNA-recombinante contra o vírus tipo B desde 1994 (FUNASA, 2002). O controle e prevenção da hepatite B se tornou indispensável, desde que o tratamento pode, muitas vezes, ser insatisfatório. Atualmente, o uso de vacinas tem reduzido o número de portadores e protegido contra a infecção. Entretanto, tem surgido novas variações do VHB que podem influenciar no comportamento viral, levando a um escape do sistema imunológico e alterar a evolução clínica do hospedeiro (MORIYAMA *et al.*, 1996).

A genotipagem do VHB e a identificação de sítios de mutações passou a ser de grande valor não somente para determinação da distribuição geográfica mas, também, para associações clínico-epidemiológicas. Várias questões emergem, tais como: a influência do genótipo do VHB na resposta terapêutica, que ainda não está clara, como no caso do VHC; os genótipos afetam o perfil da doença, como relatado em estudos recentes que sugerem que infecções com o VHB do genótipo C estão associados com a doença hepática mais grave, incluindo HCC, do que infecções com o genótipo B (DING *et al.*, 2001); pacientes brancos com o genótipo A tem maior chance de eliminar o VHB-DNA e tem melhor aspecto histológico em biópsia de fígado do que pacientes infectados pelo genótipo D (SANCHEZ-TAPIAS *et al.*, 2002).

Embora o presente estudo não tenha focalizado a epidemiologia clínica desta virose, nós buscamos identificar os genótipos e estudar as variações genômicas das regiões pré-S e S do VHB. Com esta finalidade 40 amostras de soros de pacientes

portadores do VHB, sendo 28 AgHBe positivos, provenientes de Salvador-BA e 12 AgHBs positivos, provenientes de Rio Branco-AC, foram submetidas a detecção do VHB-DNA por *Nested-PCR* para as regiões pré-S e S. O baixo percentual de amostras detectáveis pela PCR, 57,5% (23/40), se deve provavelmente ao longo tempo de estocagem e possível degradação do DNA viral, não descartando a possibilidade destas amostras terem uma baixa carga viral.

O perfil genotípico do VHB identificado neste estudo, através do sequenciamento parcial das regiões pré-S e S e análise filogenética é similar ao de outras regiões brasileiras, onde os genótipos A, D e F tem sido detectados (MORAES *et al.*, 1996; TELES *et al.*, 1999; SITNIK *et al.*, 2004). Entre as amostras provenientes do norte do Brasil foi possível identificar a presença de três genótipos A (55,6%), D (22,2%) e F (22,2%), corroborando com alguns estudos prévios já realizados em populações daquela região (VIANA, 2003). A presença do genótipo F é consistente com uma população ameríndia (NAUMANN *et al.*, 1993), onde o subtipo *adw4* tem sido predominante nas regiões circunvizinhas ao estado do Acre como Chile, Argentina e Venezuela (ARAUZ-RUIZ *et al.*, 1997).

Também identificamos na Região Nordeste, na qual temos poucos estudos dos aspectos genômicos do VHB, a presença dos genótipos A (85,7%) e F (14,3%). A ausência do genótipo E, originário do continente africano, entre as amostras provenientes de Salvador, um estado com uma população constituída em sua maioria por descendentes africanos, suporta algumas hipóteses sobre a recente emergência deste genótipo naquele continente (NORDER *et al.*, 1993; QUINTERO *et al.*, 2002). A grande diversidade genotípica do VHB circulante no Brasil pode ser explicada pela diversidade racial de nossa população, formada por europeus e africanos onde os

genótipos A e D são comuns e sua posterior miscigenação com os nativos aborígenes, onde o genótipo F predomina.

Mudanças no genoma do VHB tem sido encontradas durante a infecção viral crônica; estas mudanças incluem mutações e deleções nas regiões pré-S/S que codificam as proteínas virais do envelope do VHB que podem causar variações dos epitopos virais com implicação nos processos de neutralização viral pela resposta imune e conseqüentemente com implicações no aparecimento de diferentes formas clínicas da virose (MCMAHON *et al.*, 1992). Mudanças nos aminoácidos da região S se devem a pressão seletiva, devido ao fato da existência de ORFs sobrepostas e ausência de sítios sinônimos na maioria das sequências codificadoras, e podem ocorrer como forma de evasão imune (SIMMONDS, 2001).

A significância de muitas destas mutações permanecem por serem entendidas, algumas podem conferir vantagens de sobrevivência ao vírus mutante sobre o vírus selvagem, escapando da resposta imune ou melhorando a replicação viral (CHISARI & FERRARI, 1995). Estudos recentes sugerem que tais mutações podem ser selecionadas durante o curso da infecção crônica por dispararem a replicação viral (HAMASAKI *et al.*, 1994; SCAGLIONI *et al.*, 1997).

Mutações dos nucleotídeos nos genes pré-S e S, os quais expressam diferentes proteínas de superfície, tem aumentado tanto espontaneamente quanto após tratamento com Interferon ou vacinação; e acredita-se que estas mutações estão relacionadas a um mecanismo de escape do sistema imune (KIDD-LJUNGGREN, 1996). Sítios importantes tem sido identificados na região pré-S, incluindo o promotor do principal AgHBs, epítomos para células T e B, e sítio para ligação do VHB aos hepatócitos (HOWARD & ALLISON, 1995). Deleções nesta região podem afetar a replicação viral, resultando em infecção crônica devido ao

escape do vírus à vigilância imunológica (CHEN & OON, 2002). A análise das sequências de aminoácidos da região S identificou a presença de uma mutação L109P, localizada dentro da alça imunodominante (aa 101-163) em uma amostra do genótipo A proveniente de um paciente com a doença crônica (HB38), mutação esta que necessita de uma melhor análise e busca de correlação com a evolução clínica do paciente.

No presente estudo não detectamos a presença de mutações na região do determinante “a” (aa 124-147) e do sítio de adesão ao hepatócito (aa 21-47) (NEURATH *et al.*, 1986). Entretanto, mutações pontuais foram encontradas na região Pré-S, sendo uma em amostra proveniente de paciente com infecção crônica portador do genótipo A, G02E e Y129H. Estudos prévios tem demonstrado uma alta prevalência de variações na região pré-S2 do VHB em pacientes com infecção crônica (SANTANTONIO *et al.*, 1992). Também identificamos uma mutação no CCAAT *box*, elemento regulatório da região promotora do gene S em uma amostra do genótipo F originária de um paciente com infecção crônica. Além disto, através da análise filogenética, foi identificada uma alta similaridade entre a sequência desta amostra e a de uma outra amostra do genótipo F (HB03) originada de um paciente que teve uma infecção pelo VHB aguda, evoluindo para cura e eliminação do DNA viral. Isto é compreensível, porque variações nesta região do genoma viral está associada a uma fraca expressão do AgHBs (TORRE & NAOUMOV, 1998).

As análises filogenéticas permitiram fazer correlações do perfil genômico de nossas amostras com outras provenientes de todo o mundo, tornando possível a identificação de sequências similares já depositadas no Genbank. Duas de nossas amostras do genótipo D, positivas para o AgHBs, foram agrupadas com sequências de isolados Italianos (Genbank X65257/X65258), na qual temos AgHBs negativo e

positivo com doença hepática crônica. Este achado é revelante para a saúde pública, pois podemos ter vírus com estas características circulante em nossa comunidade e os pacientes infectados pelo VHB que não expressam o antígeno de superfície podem escapar á detecção pelos testes sorológicos utilizados na rotina laboratorial.

Com as seqüências obtidas da região S foi possível realizar análises filogenéticas e avaliar mutações pontuais, mas não dispúnhamos de dados suficientes para fazermos inferências á evolução da doença. Assim sendo, os nossos achados evidenciam a necessidade de programas de vigilância molecular que respondam questões como a prevalência de mutações relacionadas a específicos genótipos, evolução clínica e, em longo prazo, o impacto da vacina sobre os vírus circulantes. O monitoramento epidemiológico-molecular dos mutantes de superfície do VHB pode ser uma ferramenta importantíssima para testes de detecção do VHB em doadores de sangue e órgãos, tendo assim grande impacto nas políticas de saúde pública.

## VII. CONCLUSÕES

- A genotipagem das amostras provenientes de Salvador-Bahia, identificou o genótipo **A** em 85,7% e o genótipo **F** em 14,3%.
- Entre as amostras de Rio Branco-Acre, foram identificados os genótipos **A** (55,6%), **D** (22,2%) e **F** (22,2%).
- Com as seqüências obtidas das regiões pré-S/S foi possível realizar análises genômicas do vírus, e identificar alguns sítios de mutações, que podem estar relacionados ao processo de evolução clínica da infecção.
- A análise filogenética com parte da região S nos permitiu genotipar as amostras, mas as análises realizadas com a região pré-S + S nos ofereceu um resultado mais robusto e mais discriminador.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUZ-RUIZ, P.;H. NORDER;B. H. ROBERTSONL. O. MAGNIUS. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **J Gen Virol**, v.83, n.Pt 8, Aug, p.2059-73, 2002.
- ARAUZ-RUIZ, P.;H. NORDER;K. A. VISONAL. O. MAGNIUS. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. **J Infect Dis**, v.176, n.4, Oct, p.851-8, 1997.
- AYOOLA, E. Viral hepatitis in Africa. **New York: AR Liss**, p.161-169, 1988.
- BEASLEY, R. P.;L. Y. HWANG;C. C. LINC. S. CHIEN. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. **Lancet**, v.2, n.8256, Nov 21, p.1129-33, 1981.
- BLACKBERG, J.K. KIDD-LJUNGGREN. Mutations within the hepatitis B virus genome among chronic hepatitis B patients with hepatocellular carcinoma. **J Med Virol**, v.71, n.1, Oct, p.18-23, 2003.
- BONINO, F.;M. R. BRUNETTO;M. RIZZETTOH. WILL. Hepatitis B virus unable to secrete e antigen. **Gastroenterology**, v.100, n.4, Apr, p.1138-41, 1991.
- BOWYER, S. M.J. G. SIM. Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates. **J Gen Virol**, v.81, n.Pt 2, Feb, p.379-92, 2000.
- CARMAN, W. F.;M. R. JACYNA;S. HADZIYANNIS;P. KARAYIANNIS;M. J. MCGARVEY;A. MAKRISH. C. THOMAS. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. **Lancet**, v.2, n.8663, p.588-91., 1989.
- CHANG, C. M.;K. S. JENG;C. P. HU;S. J. LO;T. S. SU;L. P. TING;C. K. CHOU;S. H. HAN;E. PFAFF;J. SALFELDET AL. Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line. **Embo J**, v.6, n.3, Mar, p.675-80, 1987.
- CHEN, W. N.C. J. OON. Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. **FEBS Lett**, v.453, n.3, Jun 25, p.237-42, 1999.
- CHEN, W. N.C. J. OON. Pre-S deletion mutants co-exist with wild-type virus at low viral replication stage in Singapore chronic hepatitis B virus carriers. **Curr Microbiol**, v.44, n.2, Feb, p.145-7, 2002.
- CHISARI, F. V.C. FERRARI. Hepatitis B virus immunopathogenesis. **Annu Rev Immunol**, v.13, p.29-60, 1995.



- CHISARI, F. V.;P. FILIPPI;A. MCLACHLAN;D. R. MILICH;M. RIGGS;S. LEE;R. D. PALMITER;C. A. PINKERTR. L. BRINSTER. Expression of hepatitis B virus large envelope polypeptide inhibits hepatitis B surface antigen secretion in transgenic mice. **J Virol**, v.60, n.3, Dec, p.880-7, 1986.
- CODES, L.;R. S. DE JESUS;S. CUNHA;M. CRUZR. PARANA. [Frequency and implications of autoantibodies in acute viral hepatitis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.35, n.5, Sep-Oct, p.465-9, 2002.
- COUROUCE, A. M. Subtypes of HBsAg in Europe and Africa. **Bibl Haematol**, v.42, p.52-7, 1976.
- COUROUCE-PAUTY, A. M.;J. M. LEMAIREJ. F. ROUX. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. **Vox Sang**, v.35, n.5, p.304-8, 1978.
- DING, X.;M. MIZOKAMI;G. YAO;B. XU;E. ORITO;R. UEDAM. NAKANISHI. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. **Intervirology**, v.44, n.1, p.43-7, 2001.
- DODD, R. Y.N. NATH. Increased risk for lethal forms of liver disease among HBsAg-positive blood donors in the United States. **J Virol Methods**, v.17, n.1-2, Aug, p.81-94, 1987.
- ELFASSI, E.;J. L. ROMET-LEMONNE;M. ESSEX;M. FRANCES-MCLANEW. A. HASELTINE. Evidence of extrachromosomal forms of hepatitis B viral DNA in a bone marrow culture obtained from a patient recently infected with hepatitis B virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.81, n.11, Jun, p.3526-8, 1984.
- ENDERS, G. H.;D. GANEMH. E. VARMUS. 5'-terminal sequences influence the segregation of ground squirrel hepatitis virus RNAs into polyribosomes and viral core particles. **J Virol**, v.61, n.1, Jan, p.35-41, 1987.
- FRANCOIS, G.;M. KEW;P. VAN DAMME;M. J. MPHAAHLELEA. MEHEUS. Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? **Vaccine**, v.19, n.28-29, Jul 16, p.3799-815, 2001.
- FUJIE, H.;K. MORIYA;Y. SHINTANI;H. YOTSUYANAGI;S. IINOK. KOIKE. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. **Gastroenterology**, v.120, n.6, May, p.1564-5, 2001.
- FUNASA. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde. 2002
- GANEM, D.H. E. VARMUS. The molecular biology of the hepatitis B viruses. **Annu Rev Biochem**, v.56, p.651-93, 1987.
- HAMASAKI, K.;K. NAKATA;Y. NAGAYAMA;A. OHTSURU;M. DAIKOKU;K. TANIGUCHI;T. TSUTSUMI;Y. SATO;Y. KATOS. NAGATAKI. Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B. **Hepatology**, v.20, n.1 Pt 1, Jul, p.8-14, 1994.

HAWKINS, A. E.;R. J. GILSON;E. A. BICKERTON;R. S. TEDDER. V. WELLER. Conservation of precore and core sequences of hepatitis B virus in chronic viral carriers. **J Med Virol**, v.43, n.1, May, p.5-12, 1994.

HILLEMANN, M. R. Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapeutics of viral hepatitis B, with focus on reduction to practical applications. **Vaccine**, v.19, n.15-16, Feb 28, p.1837-48, 2001.

HOWARD, C. R.L. M. ALLISON. Hepatitis B surface antigen variation and protective immunity. **Intervirology**, v.38, n.1-2, p.35-40, 1995.

KAJIYA, Y.;K. HAMASAKI;K. NAKATA;Y. NAKAGAWA;S. MIYAZOE;Y. TAKEDA;K. OHKUBO;T. ICHIKAWA;K. NAKAO;Y. KATOK. EGUCHI. Full-length sequence and functional analysis of hepatitis B virus genome in a virus carrier: a case report suggesting the impact of pre-S and core promoter mutations on the progression of the disease. **J Viral Hepat**, v.9, n.2, Mar, p.149-56, 2002.

KAO, J. H.;P. J. CHEN;M. Y. LAID. S. CHEN. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, v.118, n.3, Mar, p.554-9, 2000.

KAO, J. H.;N. H. WU;P. J. CHEN;M. Y. LAID. S. CHEN. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. **J Hepatol**, v.33, n.6, Dec, p.998-1002, 2000.

KHAN, N.;M. GUARNIERI;S. H. AHN;J. LI;Y. ZHOU;G. BANG;K. H. KIM;J. R. WANDSS. TONG. Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene. **J Virol**, v.78, n.7, May, p.3262-70, 2004.

KIDD-LJUNGGREN, K. Variability in hepatitis B virus DNA: phylogenetic, epidemiological and clinical implications. **Scand J Infect Dis**, v.28, n.2, p.111-6, 1996.

KOCK, J.;E. M. BORSTH. J. SCHLICHT. Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. **J Virol**, v.70, n.9, Sep, p.5827-31, 1996.

LAURE, F.;D. ZAGURY;A. G. SAIMOT;R. C. GALLO;B. H. HAHNC. BRECHOT. Hepatitis B virus DNA sequences in lymphoid cells from patients with AIDS and AIDS-related complex. **Science**, v.229, n.4713, Aug 9, p.561-3, 1985.

LEE, W. M. Hepatitis B virus infection. **N Engl J Med**, v.337, n.24, Dec 11, p.1733-45, 1997.

LINDH, M.;C. HANNOUN;A. P. DHILLON;G. NORCRANS. HORAL. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. **J Infect Dis**, v.179, n.4, Apr, p.775-82, 1999.

LOK, A. S.B. J. MCMAHON. [AASLD Practice Guidelines. Chronic hepatitis B: update of therapeutic guidelines]. **Rom J Gastroenterol**, v.13, n.2, Jun, p.150-4, 2004.

- LU, C. C.;M. CHEN;J. H. OUT. S. YEN. Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression. **Virology**, v.206, n.2, Mar 1, p.1155-8, 1995.
- LU, X.;T. M. BLOCKW. H. GERLICH. Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line. **J Virol**, v.70, n.4, Apr, p.2277-85, 1996.
- MAGNIUS, L. O.H. NORDER. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. **Intervirol**, v.38, n.1-2, p.24-34, 1995.
- MAHONEY, F. J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. **Clin Microbiol Rev**, v.12, n.2, Apr, p.351-66, 1999.
- MARTELLI, C. M.;M. TURCHI;F. J. SOUTO;A. SAEZ-ALQUEZAR;A. L. ANDRADEF. ZICKER. Anti-HBc testing for blood donations in areas with intermediate hepatitis B endemicity. **Rev Panam Salud Publica**, v.6, n.1, Jul, p.69-73, 1999.
- MCCMAHON, G.;P. H. EHRLICH;Z. A. MOUSTAFA;L. A. MCCARTHY;D. DOTTAVIO;M. D. TOLPIN;P. I. NADLERL. OSTBERG. Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant patients. **Hepatology**, v.15, n.5, p.757-66., 1992.
- MILNE, A.;G. K. ALLWOOD;C. D. MOYES;N. E. PEARCEC. R. LUCAS. Prevalence of hepatitis B infections in a multiracial New Zealand community. **N Z Med J**, v.98, n.782, Jul 10, p.529-32, 1985.
- MORAES, M. T.;S. A. GOMESC. NIEL. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brazil. **Arch Virol**, v.141, n.9, p.1767-73, 1996.
- MORIYAMA, K.;H. OKAMOTO;F. TSUDAM. MAYUMI. Reduced precore transcription and enhanced core-pregenome transcription of hepatitis B virus DNA after replacement of the precore-core promoter with sequences associated with e antigen-seronegative persistent infections. **Virology**, v.226, n.2, p.269-80., 1996.
- NAUMANN, H.;S. SCHAEFER;C. F. YOSHIDA;A. M. GASPAR;R. REPPW. H. GERLICH. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. **J Gen Virol**, v.74 ( Pt 8), Aug, p.1627-32, 1993.
- NEURATH, A. R.;S. B. KENT;N. STRICKK. PARKER. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. **Cell**, v.46, n.3, Aug 1, p.429-36, 1986.
- NORDER, H.;A. M. COUROUCEL. O. MAGNIUS. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**, v.198, n.2, p.489-503., 1994.

NORDER, H.;A. M. COUROUCEL. O. MAGNIUS. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. **J Gen Virol**, v.73 ( Pt 12), Dec, p.3141-5, 1992.

NORDER, H.;B. HAMMAS;S. D. LEE;K. BILE;A. M. COUROUCE;I. K. MUSHAHWARL. O. MAGNIUS. 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**, v.74 ( Pt 7), Jul, p.1341-8, 1993.

NORDER, H.;B. HAMMAS;S. LOFDAHL;A. M. COUROUCEL. O. MAGNIUS. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. **J Gen Virol**, v.73 ( Pt 5), May, p.1201-8, 1992.

OKAMOTO, H.;F. TSUDA;H. SAKUGAWA;R. I. SASTROSOEWIGNJO;M. IMAI;Y. MIYAKAWAM. MAYUMI. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **J Gen Virol**, v.69, n.Pt 10, p.2575-83., 1988.

PERILLO, R. M., A.L. Therapy for Hepatitis B Virus infection. **Clinics Gastroenterology of North America**, v.23, n.3, p.581-602, 1994.

QUINTERO, A.;D. MARTINEZ;B. ALARCON DE NOYA;A. COSTAGLIOLA;L. URBINA;N. GONZALEZ;F. LIPRANDI;D. CASTRO DE GUERRAF. H. PUJOL. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Afro-Venezuelan populations. **Arch Virol**, v.147, n.9, Oct, p.1829-36, 2002.

SANCHEZ-TAPIAS, J. M.;J. COSTA;A. MAS;M. BRUGUERAJ. RODES. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. **Gastroenterology**, v.123, n.6, Dec, p.1848-56, 2002.

SANTANTONIO, T.;M. C. JUNG;R. SCHNEIDER;D. FERNHOLZ;M. MILELLA;L. MONNO;G. PASTORE;G. R. PAPEH. WILL. Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. **Virology**, v.188, n.2, Jun, p.948-52, 1992.

SCAGLIONI, P. P.;M. MELEGARIJ. R. WANDS. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. **Virology**, v.233, n.2, p.374-81., 1997.

SCHLICHT, H. J.;A. VON BRUNNL. THEILMANN. Antibodies in anti-HBe-positive patient sera bind to an HBe protein expressed on the cell surface of human hepatoma cells: implications for virus clearance. **Hepatology**, v.13, n.1, Jan, p.57-61, 1991.

SHAPIRO, C. N. Transmission of hepatitis viruses. **Ann Intern Med**, v.120, n.1, Jan 1, p.82-4, 1994.

- SHEN, H. D.;K. B. CHOO;S. D. LEE;Y. T. TSAIS. H. HAN. Hepatitis B virus DNA in leukocytes of patients with hepatitis B virus-associated liver diseases. **J Med Virol**, v.18, n.3, Mar, p.201-11, 1986.
- SIMMONDS, P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. **J Gen Virol**, v.82, n.Pt 4, Apr, p.693-712, 2001.
- SITNIK, R.;J. R. PINHO;D. A. BERTOLINI;A. P. BERNARDINI;L. C. DA SILVA. J. CARRILHO. Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. **J Clin Microbiol**, v.42, n.6, Jun, p.2455-60, 2004.
- SOUTO, F. J.;C. J. FONTES;A. M. GASPARL. G. LYRA. Hepatitis B virus infection in immigrants to the southern Brazilian Amazon. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.92, n.3, May-Jun, p.282-4, 1998.
- STUYVER, L.;S. DE GENDT;C. VAN GEYT;F. ZOULIM;M. FRIED;R. F. SCHINAZIR. ROSSAU. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **J Gen Virol**, v.81, n.Pt 1, Jan, p.67-74, 2000.
- SUGAUCHI, F.;T. OHNO;E. ORITO;H. SAKUGAWA;T. ICHIDA;M. KOMATSU;T. KURAMITSU;R. UEDA;Y. MIYAKAWAM. MIZOKAMI. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. **J Med Virol**, v.70, n.4, Aug, p.537-44, 2003.
- TAI, P. C.;F. M. SUK;W. H. GERLICH;A. R. NEURATHC. SHIH. Hypermodification and immune escape of an internally deleted middle- envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. **Virology**, v.292, n.1, p.44-58., 2002.
- TELES, S. A.;R. M. MARTINS;B. VANDERBORGHT;L. STUYVER;A. M. GASPARC. F. YOSHIDA. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. **Artif Organs**, v.23, n.12, Dec, p.1074-8, 1999.
- TIOLLAIS, P.;C. POURCELA. DEJEAN. The hepatitis B virus. **Nature**, v.317, n.6037, Oct 10-16, p.489-95, 1985.
- TORRE, F.N. V. NAOUMOV. Clinical implications of mutations in the hepatitis B virus genome. **Eur J Clin Invest**, v.28, n.8, Aug, p.604-14, 1998.
- VIANA, S. Estudo Soroepidemiológico das Hepatites B e Delta na População de Doze Municípios do Estado do Acre. Faculdade de Medicina, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, 2003. 154 p.
- WANDS, J. R.;T. J. LIANG;H. E. BLUMD. A. SHAFRITZ. Molecular pathogenesis of liver disease during persistent hepatitis B virus infection. **Semin Liver Dis**, v.12, n.3, Aug, p.252-64, 1992.
- WEBER, B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. **J Clin Virol**, v.32, n.2, Feb, p.102-12, 2005.

WEINBERGER, K. M.;T. BAUER;S. BOHMW. JILG. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. **J Gen Virol**, v.81, n.Pt 5, May, p.1165-74, 2000.

WHO, W. H. O. Hepatitis B vaccines: WHO. 79: 255-263 p., 2004.

## IX. ANEXOS

### ANEXO I

**Genotypic distribution of hepatitis B virus in the Czech Republic: a possible association with modes of transmission and clinical outcome.** Krekulova, L., Rehak, V., Da Silva Filho, H. P., Zavoral, M., Riley, L. W. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003 Nov;15(11):1183-8.

# Genotypic distribution of hepatitis B virus in the Czech Republic: a possible association with modes of transmission and clinical outcome

Laura Krekulova<sup>a,c</sup>, Vratislav Rehak<sup>b</sup>, Hermes Pedreira da Silva Filho<sup>c</sup>, Miroslav Zavoral<sup>a</sup> and Lee W. Riley<sup>c</sup>

**Objective** The relationship between hepatitis B virus (HBV) genotype with disease or treatment outcome is beginning to be characterized. However, the link between genotype and disease transmission route has not been closely examined. We addressed this question in high-risk populations in Prague, Czech Republic.

**Design** Patients with HBV infection were consecutively recruited into the study at an outpatient clinic between June 2000 and March 2001. Their serum samples were analysed for HBV S gene segments by polymerase chain reaction (PCR) test. The amplified product sequences were compared to those of known HBV genotypes. Patients were evaluated for other virus co-infections, and parenteral and sexual exposure histories.

**Results** Of 57 consecutively recruited patients with evidence of HBV infection, 45 (79%) had PCR-detectable S gene sequences. Only genotypes A ( $n = 33$ ; 73%) and D ( $n = 12$ ; 27%) were found. There was no difference in the development of chronic infection between the two genotypes. Of nine patients co-infected with TTV, all were infected with HBV genotype A. There was a trend towards an association between number of lifetime sex partners and genotype A but not genotype D.

**Conclusions** In Prague, the number of HBV genotypes appears to be limited compared to other northern European countries, suggesting that the virus has recently spread in the high-risk populations. While a large proportion of HBV infections occur in intravenous drug users, a subset of HBV genotype A may be transmitted by sexual contact. An HBV subtype may influence modes of transmission of HBV. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15:1183–1188 © 2003 Lippincott Williams & Wilkins

*European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2003, 15:1183–1188

**Keywords:** hepatitis B, HBV genotypes, HBV transmission, TTV, Prague, Czech Republic

<sup>a</sup>2<sup>nd</sup> Department of Internal Medicine, Central Military Hospital Prague, Postgraduate Institute of Gastroenterology, <sup>b</sup>Dr Svoboda's Clinic-Medicine-Immunology, Prague, Czech Republic and <sup>c</sup>Division of Infectious Diseases, School of Public Health, University of California, Berkeley, California 94720 USA.

Sponsorship: This work was supported by NIH Fogarty International Center grant number TW00905.

Correspondence and requests for reprints to Lee W. Riley MD, School of Public Health, UC Berkeley, 140 Warren Hall, Berkeley, CA 94720, USA. Tel: +1 510 642 9200; fax: +1 510 642 6350; e-mail: lriley@uclink4.berkeley.edu

Received 7 August 2002 Revised 19 February 2003 Accepted 23 April 2003

## Introduction

More than 350 million people in the world are estimated to be chronic carriers of hepatitis B virus (HBV) [1]. In the Czech Republic, 500–600 cases of acute hepatitis B are notified annually [2]. Although the incidence has steadily decreased over the last 20 years, partly due to screening programmes for blood supply introduced in the late 1970s, and partly due to vaccination programmes for high-risk groups over the last 15 years, hepatitis B remains an important cause of morbidity and mortality in the Czech Republic. In 1996, based on a survey performed by the Czech State Institute of Health, the seroprevalence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) was 0.7% and the prevalence of anti-hepatitis B core antigen (HBc) was 5%. In 2001, 457 new cases of acute HBV were reported in the

entire Czech Republic, and at least 28% of them were related to intravenous drug use (IDU) [2]. The increasing practice of IDU in the last 10 years has contributed to a rapid increase in the incidence of both HBV and hepatitis C virus (HCV) infections among certain segments of the population. The recent rise in IDU within the Czech Republic has established a new population into which HBV has spread. This has offered a unique opportunity to study the distribution and epidemiology of HBV strain types in the Czech Republic.

HBV genotype distribution in the Czech Republic has not been studied to date. HBVs are currently subtyped based on nine surface antigenic (HBsAg) determinants (*ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adry+* and *adry-*) [3] and HBV genotypes are defined by nucleo-



vide sequence divergence in the entire genome of more than 8% or sequence diversity in the *S*-gene region of more than 4.1% [4,5]. Seven genotypes (A to G) have so far been identified [5,6], which vary in their geographical distribution. Genotype A is widely distributed, predominating in northern Europe, North America and Central Africa, while genotypes B and C are found in eastern Asia and the Far East, and genotype D is pandemic. Genotype E is reported in Africa and genotype F is found in Aboriginal populations in the Americas [5,7]. Most recently, genotype G has been found among samples from infected persons in France and the USA [6].

HBV is associated with a wide range of clinical manifestations, from acute self-limiting hepatitis to fulminant liver failure. Those who develop chronic infection are at risk for progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Chronic infection occurs in 90% of infants infected at birth, 25–50% of children infected at 1–5 years of age and about 2–6% of persons infected as older children or adults [8].

While the association of certain HCV genotypes (particularly genotype 1) with poor therapeutic response is widely observed, such an association is only beginning to be studied with HBV. Several recent reports have suggested the possible association of certain HBV genotypes with the development of cirrhosis and HCC [9–14]. In a large recent study of histopathologically proven chronic HBV-infected patients in India, genotypes A and D were found to be prevalent in patients with chronic liver disease, but genotype D was significantly associated with a more severe histological activity index (HAI) including HCC [10].

Other reports discuss the possible association of treatment outcome with HBV genotypes. Reports from Taiwan and Japan suggest a lower response rate to interferon treatment in patients infected with genotype C [15].

Another new question related to HBV is the relationship between genotypes and modes of disease transmission. Among adults, sexual exposure to an infected partner or multiple partners and IDU account for a large majority of HBV transmissions. The recent establishment of a new, high-risk population of young and relatively healthy intravenous drug users and spread of HBV infection into this group has provided us with an opportunity to examine the relationship between the routes of HBV transmission and disease outcome with specific HBV genotypes. In this study, we characterize the genotypic distribution of HBV strains circulating among the infected population in Prague and report risk factors, mode of transmission and disease outcome associated with HBV genotypes.

## Patients and methods

### Study population

Informed consent was obtained from all subjects to participate in this study, and the clinic's human subjects committee approval was obtained prior to the initiation of the study. All study participants were citizens of the Czech Republic, permanently residing in Prague and older than 15 years, whose serum test was positive for HBsAg. The study was conducted at an outpatient clinic, which sees about 3000 patients each year. All patients visiting the clinic between June 2000 and March 2001 who tested positive for HBsAg were consecutively recruited into the study. The patients were either referred to the clinic from other health care units because of symptoms or laboratory test abnormalities consistent with hepatitis, or they were self-referred. The diagnosis of infection with HBV was based on serology as described below. None of the patients was on antiviral treatment (interferon, ribavirin, adefovir, lamivudine) at the time of serum sample collection.

### Clinical laboratory tests

Serum samples were tested in Prague for liver biochemical profiles, including serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), bilirubin and routine biochemistry profile at the time of sample collection. The reference range used in this study was 0.17–0.78  $\mu\text{kat/l}$  for ALT, 0.16–0.72  $\mu\text{kat/l}$  for AST and up to 17  $\mu\text{mol/l}$  for bilirubin; levels above 0.78  $\mu\text{kat/l}$ , 0.72  $\mu\text{kat/l}$  or 17  $\mu\text{mol/l}$ , respectively, were considered abnormal. The diagnosis of viral hepatitis B was based on commercial, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs: Monolisa AgHBs Plus and Monolisa antiHBs 3.0 BioRad, SA, Paris, France). The diagnosis was confirmed by the detection of HBV DNA using a hybridization assay (Dygene HBV DNA Hybridization Assay, Abbott, Abbott Park, Illinois, USA) for some of the samples. Serological tests for hepatitis A and C were performed in each case (using ELISA; hepatitis A virus [HAV] IgM assay; HAV total assay; and Monolisa antiHCV Plus vers 2, BioRad). For those samples with reactive anti-HCV antibody the hepatitis C infection status was confirmed with reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for HCV RNA (Roche Amplicor, Roche Molecular Systems, Inc. Pleasanton, California, USA). HIV infection status was assessed in all participants by ELISA (Genscreen, HIV-1/2 vers 2, BioRad).

Patients recruited into the study were followed prospectively at the clinic until recovery, which was defined as persistently normal liver function tests (LFTs) and the development of an antibody against HBsAg. Study subjects whose HBsAg remained detectable for more than 6 months were considered to have

chronic HBV infection. Those who developed chronic HBV were followed indefinitely.

The PCR technique for detection of HBV DNA was as follows. Serum samples collected prospectively from June 2000 to March 2001 were stored at -70°C prior to testing in order to minimize viral DNA degradation. All sera were shipped on dry ice to the University of California, Berkeley, where the molecular biological testing for this study was performed. All samples were analysed under similar conditions in a double-blinded fashion.

Viral DNA was extracted from 100 µl aliquots of serum with the silica particle purification method described previously by Boom *et al.* [16]. Extracted DNA was immediately processed. The S region of the HBV was chosen as a target of PCR amplification according to a previously published method [6]. Two overlapping segments spanning the entire sequence of the S gene were amplified by PCR with primer pairs HB1-HB2 and HB3-HB4 (Table 1) [17]. The first amplification was performed in a volume of 20 µl containing 5 µl of the extracted DNA, 10X *Taq* polymerase buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl and 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 200 µM each dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 µM primers and 1.25 U AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The mixture was heated to 95°C for 5 min followed by 40 cycles each consisting of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 7 min. A 2 µl aliquot of the first PCR product was then used in a nested PCR step with the internal primer pairs HB5-HB6 for the HB1-HB2 amplification or HB7-HB8 for the HB3-HB4 amplification. The nested PCR was performed in 40 µl under the same condition as the first reaction, with 1 µM of each primer using 35 cycles. Amplified products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis in 1X Tris borate-EDTA buffer, stained with ethidium bromide, and visualized by UV transillumination. A 100 bp ladder (Gibco BRL, Grand Island, New York, USA) was used as a molecular size marker in each gel.

Table 1 Primers used for detection of the S region of HBV DNA

Primers	Position	Sequence (5'-3')
HB1	56-70	TAT CTT CCT GCT GGT GGC TCC
HB2	736-755	AAT ACC ACA TCA TCC ATA TA
HB3	637-650	CCT ATG GGA GTG GG
HB4	970-986	ACT TTC CAA TCA ATA GG
HB5	78-97	GAA CAG TAA ACC CTG CTC CG
HB6	726-745	CAT CCA TAT AGC TGA AAG CC
HB7	659-678	CGT TTC TCT TGG CTC AGT TT
HB8	910-929	TGT ACA ATA TGA TCC TGT GG

The primer sequences were based on the sequence of prototype DNA AF461043 (gi: 18252589).

The amplified DNA fragments were purified with the QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) and sequenced in both directions by dideoxynucleotide chain termination reactions with the ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Corp., Foster City, California, USA). The sequences were compared to prototype HBV genotype sequences deposited in GenBank by DNASIS software (Hitachi, South San Francisco, California, USA). The accession numbers of the sequences used were as follows: AF160501, L08805, M54923, X65259, X70185, X75658, and X75664.

**Epidemiological analysis**

After giving their informed consent, patients enrolled into this study were interviewed and a standardized questionnaire soliciting information about their possible risk factors, exposures and behavioural practices was completed. In addition to their demographic characteristics, they were asked specifically about possible parenteral exposure history and sexual practices and preferences (Table 2). Only those patients whose questionnaires were completed properly and only responses given by more than 90% of the patients were included in the analysis.

Table 2 Demographic, laboratory and epidemiological features of patients with HBV infection in Prague, Czech Republic, by HBV genotype A and D (n = 45)

Characteristic	Genotype A	Genotype D	Total*
Gender			
Male	25	7	32
Female	8	5	13
Age (years; mean)	31.1	26.4	29.8
ALT (µkat/l; mean)	5.6	7.0	6.0
Anti-HAV IgG positive	9	1	10
Anti-HCV antibody positive	8	0	8
TTV DNA detected by PCR	9	0	9
Acute infection	15	5	20
Chronic infection	18	7	25
Use of intravenous drugs			
Yes	18	5	23
No	15	7	22
Blood transfusion			
Yes	1	1	2
No	23	10	33
Surgery			
Yes	13	4	17
No	12	7	19
Haemodialysis			
Yes	0	0	0
No	24	11	35
Tattoo			
Yes	3	0	3
No	22	11	33
Body piercing			
Yes	6	3	9
No	19	8	27
Number of lifetime sex partners			
0	1	0	1
1-2	2	2	4
3-5	10	5	15
>5	13	4	17

\*Includes the number of patients who responded to the question.

### Statistical analysis

Laboratory and epidemiological information was analysed by EpiInfo version 6.04 (CDC, WHO). Dichotomous variables were compared by chi-squared or Fisher's exact tests. Continuous variables were compared by the Student's *t*-test or Kruskal–Wallis test. Differences in levels of exposure were compared by the chi-squared test for trend of ordered data (RIDIT) [18]. All *P* values were based on two-sided tests.

### Results

Between June 2000 and March 2001, 57 HBsAg-positive patients were consecutively enrolled into the study, of whom 42 were men (74%) and 15 were women. The mean age was 28.6 years with a median of 21 years (range 15–77 years). The mean age of the men was 29.7 years (range 17–77 years) and that of the women was 25.6 years (range 15–51 years).

Serum samples from each patient were tested for the presence of HBV DNA by a PCR test as described above. HBV DNA was detectable in 47 (82%) of the 57 participants. The remaining 10 patients had undetectable HBV DNA, which suggested absent or very low levels of viraemia at the time of enrolment. Of the 47 HBV-positive patients, we were able to genotype 45 samples by sequencing (the PCR product signal was too weak from the remaining two samples for sequence analysis). These 45 samples comprised two genotypes: 33 of genotype A (73%) and 12 of genotype D (27%) (Table 2). Men comprised 25 (76%) of the 33 genotype A-infected patients and seven (58%) of the 12 genotype D-infected patients. The mean age was 31.1 years (range 15–77 years) for those infected with genotype A, and 26.4 years (range 17–49 years) for those infected with genotype D.

Of the 47 patients, 46 (98%) were tested for the anti-HAV IgG antibody and 14 (30%) were positive, suggesting that these patients also had previous hepatitis A infection. Of 47 HBV DNA-positive samples, 11 tested positive for the anti-HCV antibody; of these, four (36%) were also found to be positive by RT-PCR for HCV. All four HBV/HCV co-infected samples belonged to patients who admitted injecting drugs. Of 45 patients infected with known HBV genotype, all were tested for the presence of TTV infection. Nine patients (20%) were infected with TTV, all of them co-infected with HBV genotype A.

All of the patients whose initial diagnosis was based on HBsAg were followed prospectively at the outpatient clinic. Of 33 patients infected with genotype A, 15 (45%) had acute symptomatic disease with complete seroconversion during the follow-up period, while 18 (55%) developed chronic disease, as defined by persistence of HBsAg for more than 6 months of follow-up.

Of the 12 patients infected with HBV genotype D, five (42%) had acute disease while seven (58%) developed chronic infection. Thus, there was no difference in the frequency of development of chronic infection in patients between the two genotypes.

Among those who were enrolled in the study, 30 (53%) admitted current or past use of injected drugs. Of 45 patients infected with known HBV genotypes, 23 (51%) gave a history of IDU. Of these 23 patients, 18 (78%) were infected with genotype A and five with genotype D (Table 2).

There was no relationship between the particular HBV genotype infection and any of the following risk factors: history of blood transfusion, dialysis, major surgery, tattooing or body piercing. However, genotype A showed a linear trend with increasing number of lifetime sex partners, whereas genotype D showed no such relationship. Among those who reported 1–2, 3–5, or  $\geq 5$  lifetime sex partners, two (8%), 10 (40%), and 13 (52%) were infected with genotype A, respectively, whereas two (18%), five (46%), and four (36%) were infected with genotype D, respectively ( $P = 0.315$ , RIDIT) (Table 2).

### Discussion

The prevalence of genotype A in Prague found in this study is similar to other observations from northwestern Europe, but the relative genotype uniformity and absence of genotypes other than A and D is atypical. In Belgium, genotypes A and D were reported to account for 61% and 30% of HBV infections, respectively, but additional genotypes (B and E) were found [19]. In France, multiple genotypes were also detected, including the newly identified genotype G [6]. In an ongoing multicentre study in the USA, all seven genotypes were found: genotype G was the most common (34%), followed by A (33%), B (21%), D (9%), and E, F and G (1% each) [20]. The limited distribution in Prague is consistent with the idea that these genotypes have recently spread to high-risk subpopulations, possibly due to increasing IDU over the last decade. This HBV distribution is similar to the HCV distribution observed in Prague, where genotype 1 accounted for 97% [21]. HCV subtypes other than 1b were unusual in the city in both IDU and non-IDU populations [21].

Several recent studies suggest a possible association of HBV genotypes with a defined clinical outcome. Genotype C was reported to be associated with more severe liver injury, fibrosis and tendency for more severe inflammation [22]. In Asia, genotype C was also reported to be associated with higher HBV DNA levels as compared to genotypes A and D and with more extensive liver damage [11]. The association of genotype B with the development of HCC in patients

younger than 50 years in Taiwan was described by Kao *et al.* [12]. In contrast, genotype C HBV was found to be closely associated with the development of HCC in Japan at any age, and genotype D was associated with HCC in India [10,13]. One study from Switzerland found a possible relationship between HBV genotype A and the development of chronic disease. HBV genotype D was found to be more prevalent among patients with resolving acute hepatitis B [23].

In our study population, the high proportion of chronic HBV infection may have been because some of the patients were referred to the study clinic with already established chronic disease. The patient selection criterion was based on the presence of HBsAg. We found no difference in the frequency of development of chronic disease with genotype A or D infection. However, we also examined the possible relationship between HBV genotype and mode of transmission. Since HBV is predominantly transmitted parenterally and by sexual contact, we wished to determine if these distinct genotypes were dependent on specific modes of transmission. In the Czech Republic, after introduction of routine screening for HBsAg in the late 1970s, almost all parenteral HBV transmissions occurred by IDU. However, for a substantial proportion of all HBV cases (about 50%), such a history is not obtained. Most patients infected with HBV who denied IDU also denied a history of other possible parenteral exposures, including blood transfusion, haemodialysis, surgery, tattooing or piercing. While not statistically significant, the prevalence of genotype A but not genotype D correlated with an increasing number of lifetime sex partners. Interestingly, our finding of HBV genotype A and TTV co-infection further supports this possibility. Our previous report found that subjects who reported more than five lifetime sex partners were significantly more likely to be infected with TTV than those with fewer or no lifetime sex partners [24].

In the present study, all of the HBV-infected persons who were co-infected with TTV were infected with HBV genotype A. (Two of the strains from TTV co-infected persons were 100% identical. These two patients had no epidemiological linkage, and the samples were collected 14 months apart.) Although the number of study participants is small and the difference is not statistically significant, this observation may suggest that different HBV genotypes have different routes of transmission. The small sample size of this study could have contributed to the lack of a statistically significant association between genotype A strains and sexual transmission. Nevertheless, this study introduces a new idea that should be explored further with a larger sample size study. Identification of a subset of HBV strains that are more likely to be transmitted sexually may lead to an improvement in prevention of HBV

infections, such as altering vaccine design to interrupt such modes of transmission more efficiently.

### Acknowledgement

We thank Ivan Krekule PhD and Cecil H. Hocky for helpful criticisms and suggestions. We also thank Patrick Killoran and Nora Madrigal for technical assistance.

### Conflict of interest

None declared.

### Authors' contributions

Krekulova, Rehak, and Zavoral designed the study, facilitated patient recruitment, and collected data. Krekulova, Pedreira and Riley conducted the genotype analyses. Krekulova and Riley analysed the data and wrote the manuscript.

### References

- 1 Kane M. Global strategies for the control of hepatitis B. In: Zuckerman AJ (editor): *Prevention of Hepatitis B*. London: Royal College of Physicians; 1996, pp. 87–96.
- 2 Krekulova L, Rehak V. *Viral Hepatitis, Prevention, Diagnosis and Treatment*. 2nd ed. Triton: Prague; 2002.
- 3 Couroucé-Pauty AM, Lemaire JM, Roux JF. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. *Vox Sanguinis* 1978; **35**: 304–308.
- 4 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosowignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; **69**:2575–2583.
- 5 Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; **198**: 489–503.
- 6 Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; **81**:67–74.
- 7 Kidd-Ljunggren K. Variability in hepatitis B virus DNA: phylogenetic, epidemiologic, and clinical implications. *Scand J Infect Dis* 1996; **28**:111–116.
- 8 Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; **12**:351–366.
- 9 Margolis HS, Aitler MJ, Hadler SC. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Semin Liver Dis* 1991; **11**:84–92.
- 10 Thakur V, Gupta 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; **17**:165–170.
- 11 Lindh M, Hannoun C, Dhillo AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999; **179**:775–782.
- 12 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.
- 13 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.
- 14 Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001; **44**:43–47.
- 15 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.
- 16 Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; **28**:495–503.
- 17 Koibushi T, Nakamura T, Nojiri N, Nakajima K, Juji T, Iwamoto A. Shifting in genotype trends of hepatitis B virus in Japan [Abstract 588]. *Abstracts of the IDSA 38th Annual Meeting*. New Orleans, 2000, p. 142.
- 18 Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. 2nd ed. New York: Wiley; 1981.
- 19 Liu HF, Sokal E, Goubau P. Wide variety of genotypes and geographic origins of hepatitis B virus in Belgian children. *J Ped Gastroenterol Nutr* 2001; **32**:274–277.
- 20 Lok ASF, Chu CJ. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology* 2002; **35**:1274–1276.

- 21 Krekulova L, Rehak V, Madrigal N, Johnson M, Killoran P, Riley LW. Genotypic and epidemiologic characteristics of hepatitis C virus infections among recent injection drug user and nonuser populations. *Clin Infect Dis* 2001; **33**:1435-1438.
- 22 Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepatitis* 2000; **7**:258-267.
- 23 Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepatitis* 1999; **6**:299-304.
- 24 Krekulova L, Rehak V, Killoran P, Madrigal N, Riley LW. Genotypic distribution of TT virus (TTV) in a Czech population: evidence for sexual transmission of the virus. *J Clin Virol* 2001; **23**:31-41.