

Kliniczne znaczenie zastosowania metody PCR do wykrywania DNA wirusa zapalenia wątroby typu B

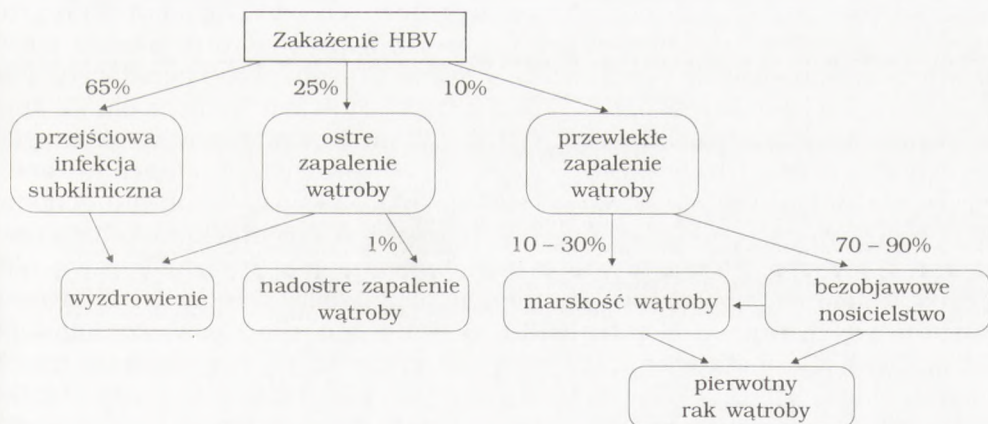
Małgorzata Sidorkiewicz

I Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii
Akademia Medyczna
Łódź

1. Wprowadzenie

Około 300 milionów ludzi na świecie jest nosicielami wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV), a w następstwie zapalenia umiera rocznie ponad 2 miliony chorych. Wiele problemów związanych z patogenezą i klinicznym przebiegiem choroby pozostaje jeszcze nie wyjaśnionych, stąd stałe zainteresowanie różnymi aspektami zakażenia HBV.

W wyniku zakażenia HBV może rozwinąć się ostre zapalenie wątroby (25%), przejściowe zakażenie o przebiegu subklinicznym (65%) oraz przewlekłe zapalenie wątroby obserwowane z częstością około 10%. Z klinicznego punktu widzenia istotną cechą HBV jest zdolność wywoływania zapalenia przewlekłego, co w konsekwencji prowadzić może do marskości wątroby i pierwotnego raka wątroby (rys.1). Wczesne określenie klinicznej postaci za-



Rys.1. Schemat ilustrujący możliwe następstwa zakażenia HBV.

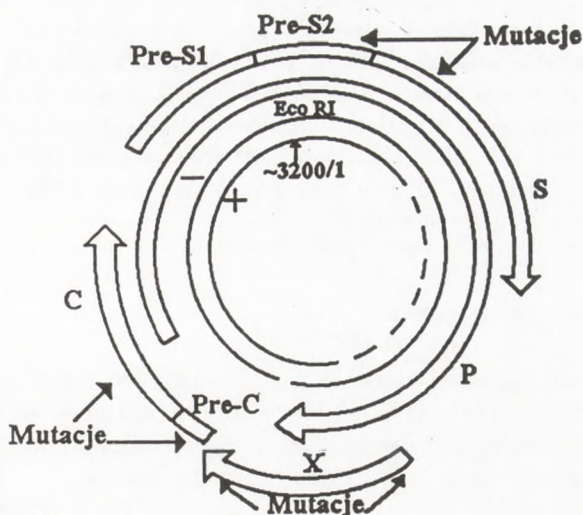
każenia HBV lub tendencji do jej zmiany ma podstawowe znaczenie w podjęciu właściwego, skutecznego leczenia.

Dotychczas stosowane oznaczenia markerów zakażenia HBV obejmują: antygen powierzchniowy — HBsAg, rozpuszczalną pochodną antygeny rdzeniowego — HBeAg oraz przeciwciała: anti-HBs, anti-HBe i skierowane przeciw białku rdzeniowemu, anti-HBc, zarówno IgG jak i IgM. W badaniach tych nie wszystkie przypadki zakażenia HBV zostają ujawnione, ze względu na niewystarczającą czułość stosowanych metod immunoenzymatycznych (najniższe stężenie HBsAg wykrywane metodą ELISA wynosi 0,38 ng/ml) oraz możliwość trafienia w badaniach na tzw. „okienko serologiczne”.

Dzięki nowej technice tzw. łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR) stała się możliwa detekcja wirusowego kwasu nukleinowego (DNA HBV) w przypadkach, gdy przy oznaczaniu HBsAg metodą ELISA uzyskuje się wynik ujemny. Metodą PCR można wykryć również obecność DNA HBV w surowicy osób, u których nastąpiła serokonwersja w układzie e (pojawienie się przeciwciał anti-HBe), czyli u tych którzy według dotychczas stosowanych kryteriów uważani byli za osoby niezakażone. Wprowadzenie oznaczania DNA HBV metodą PCR ma zatem podstawowe znaczenie w weryfikacji dotąd przyjętych w diagnostyce kryteriów zakaźności HBV. Oprócz tego stosowanie metody PCR umożliwi ocenę rozwoju zapalenia wątroby od postaci ostrej do przewlekłej, a także do określania różnych stanów nosicielstwa, wykrywania zakażenia mutantami HBV oraz monitorowania przebiegu terapii interferonowej. W dalszej części artykułu prześledzimy dokładniej specyficzne cechy metody PCR stosowanej do wykrywania HBV.

2. Budowa HBV

W surowicy osób zakażonych HBV występują trzy formy morfologiczne zawierające antygen powierzchniowy — HBsAg (1). HBsAg występuje na powierzchni pełnych cząstek wirusa oraz wchodzi w skład cząstek subwiralnych: kulistych, o średnicy 22 nm oraz podłużnych (tzw. filamentów) o grubości 20 nm. Obie te formy uważa się za niepełne struktury otoczki HBV. Wytwarzanie znacznych ilości cząstek subwiralnych przez hepatocyty jest specyficzną cechą zakażenia HBV. Pełna cząstka HBV ma średnicę ok. 42 nm. Wyróżnia się w niej elektrogesty rdzeń (22 nm) zbudowany z około 180 monomerów białka rdzeniowego — HBcAg. W wewnętrznej otoczce utworzonej przez HBcAg ukryty jest genom HBV (około 3200 pz). Struktura genomu HBV ma charakter unikatowy (2). Jest to częściowo dwuniciowa kolistą cząsteczka DNA (rys. 2) z jedną nicią niekompletną (+). Związana jest z nią, obecna w dojrzałym wirionie, endogenna polimeraza. Genom HBV zawiera kilka otwartych ramek odczytu (ORF). ORF dla antygeny powierzchniowego zawiera trzy miejsca inicjacji, co w efekcie prowadzi do powstawania trzech różnych białek HBsAg. Określone zostały one jako białko S, (małe), białko M, (średnie), zawierające oprócz sekwencji białka S dodatkową domenę preS2 oraz białko L (duże), na które składa się domena S, preS2 i preS1. Gen



Rys. 2. Schemat struktury genomu HBV z zaznaczonymi cztery ORF: preS/S, preC/C, X i P oraz miejscami znanymi z genetycznej zmienności. Długa nić genomowego DNA (-) ma długość około 3,2 kb.

preC/C odpowiedzialny jest za ekspresję antygeny rdzeniowego — HBcAg, którego obecność stwierdza się tylko w zakażonych hepatocytach oraz antygeny e, który w formie rozpuszczalnej występuje w surowicy zakażonych HBV (3). Mutacje w rejonie preC genomu mogą powodować powstawanie kodonu „stop” i uniemożliwiać sekrecję HBeAg, przy zachowaniu ciągłości wytwarzania całych cząstek wirusowych (4). Rejon P genomu koduje wirusową polimerazę o właściwościach odwrotnej transkryptazy, zaś najmniejszy wirusowy gen określony jako x odpowiada za ekspresję polipeptydu x, którego rola w cyklu życiowym wirusa nie jest do tej pory wyjaśniona.

3. Metody oznaczania markerów replikacji HBV

Oprócz wspomnianych markerów zakażenia HBV, tj. HBsAg, HBeAg, anty-HBs, anty-HBe oraz anty-HBc i anty-HBc IgM w wielu przypadkach bardzo istotne jest oznaczanie markerów replikacji, takich jak DNA HBV i polimeraza HBV (pDNA). Oznaczanie pDNA opiera się na zdolności endogennej polimerazy do tworzenia z częściowo dwuniciowego genomu HBV, całkowicie dwuniciowej molekule DNA, poprzez wbudowywanie do nici krótszej nukleotydów, z których jeden jest znakowany. Miarą aktywności polimerazy, a tym samym miarą poziomu replikacji jest uzyskiwana radioaktywność próby (5). Oznaczanie pDNA jest często stosowane do oceny przebiegu leczenia alfa-interferonem osób z przewlekłym zapaleniem wątroby (6). W wielu przypadkach, np. ze względu na niski poziom replikacji HBV, obecność w surowicy inhibitorów pDNA lub przeciwciał anty-pDNA nie udaje się wykryć aktywności polimerazy i konieczne jest oznaczanie bezpośredniego markera replikacji czyli DNA HBV. Wykrywanie DNA HBV możliwe jest dzięki użyciu techniki hybrydyzacji oraz dzięki zastosowaniu metody polimerazowej reakcji

łańcuchowej (PCR). Wykrywanie DNA HBV techniką hybrydyzacji polega na swoistej reakcji komplementarnych łańcuchów wirusowego DNA z sondą molekularną znakowaną pierwiastkiem radioaktywnym (7), związkami fluorescencyjnymi (8), enzymem (9), itp. Do oznaczania DNA HBV w surowicy stosuje się hybrydyzację typu *Southern blott* lub *dot blott*. W obu przypadkach limit wykrywalności wynosi około 10^6 cząstek wirusa/ml (rys. 4). W przypadku zastosowania polimerazowej reakcji łańcuchowej możliwe jest wykrycie HBV już przy stężeniu 10^3 cząstek/ml (10).

4. Metoda PCR w oznaczaniu DNA HBV

Polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR) opracowana została w 1985 r. przez naukowców z korporacji Cetus (11). O wartości intelektualnej i niezwykle szerokim spektrum zastosowania tej metody świadczy najlepiej fakt uhonorowania jej głównego twórcy Mullisa w 1993 r. nagrodą Nobla.

Do amplifikacji fragmentu DNA metodą PCR wystarcza aby wybrany fragment (tzw. fragment docelowy) zmieszany został w buforze trisowym z czterema trifosforanami deoksynukleozydów i termostabilną polimerazą DNA izolowaną z *Thermus aquaticus* (tzw. Taq polimerazą) oraz dwoma oligonukleotydami komplementarnymi do przeciwstawnych miejsc na dwóch niciach sekwencji docelowej. Te oligonukleotydy najczęściej określane mianem primerów wiążąc się z odpowiednią nicią DNA dostarczają krótkiego, dwuniciowego odcinka DNA, stanowiącego punkt startu dla polimerazy Taq. W tych warunkach może ona dołączając kolejne nukleotydy do primera kopiować nić komplementarną. Miejsca wiążące primery są z reguły oddalone od siebie o 100 do 500 zasad.

PCR rozpoczyna się od denaturacji podwójnej nici stanowiącej cel amplifikacji (30 s do 2 min w 92-95°C). Po tym etapie następuje szybkie oziębienie do 40-60°C (1 do 2 min), które pozwala primerom połączyć się z pojedynczą nicią docelowego DNA (*annealing*). Kolejnym etapem jest sama reakcja polimeryzacji czyli wydłużania primerów prowadzona przez 30 s do 2 min w optimum temp. dla Taq polimerazy czyli w 72°C. Po pojedynczym cyklu komplementarne nici docelowe zostają skopiowane. Ponieważ każdy cykl podwaja ilość docelowego DNA, po 30-35 cyklach dochodzi do sięgającej milionów razy amplifikacji DNA. Skuteczność metody PCR wynika z powtarzających się cykli denaturacji, przyłączania i wydłużania primerów. Fakt, że Taq polimeraza jest odporna na działanie temperatury umożliwia przeprowadzenie całego procesu w zamkniętej probówce w automatycznym termocyklerze w ciągu kilku godzin.

4.1. Wybór primerów

Wybór primerów jest głównym elementem w amplifikacji DNA. Ma on szczególne znaczenie w przypadku HBV, wykazującego dużą zmienność genetyczną (~vs. 2), wynikającą z udziału odwrotnej transkryptazy w procesie replikacji tego wirusa. Wybór primerów komplementarnych do najbardziej

zachowanych ewolucyjnie rejonów genomu HBV umożliwia wykrywanie największej liczby wariantów HBV (10,12,13,14). Przykłady zestawów primerów używanych przez różne zespoły przedstawiono w tab. 1. Niektóre primery zaprojektowane są tak, aby doprowadzić do amplifikacji specyficznych podtypów serologicznych (15) czy też umożliwić wykrycie mutantów HBV (16,17,18,19,20).

TABELA 1
PRZYKŁADY PRIMERÓW UŻYWANYCH DO WYKRYWANIA DNA HBV

Rejon	Niść	Sekwencja (5' do 3')	Pozycje nt	Literatura
C	S	GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAA	1893-1922	(10)
	A	CTGACTACTAATTCCCTGGATGCTGGGTCT	2162-2133	
pre-C, C	S	GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAA	1763-1793	(12)
	A	CTGACTACTAATTCCCTGGATGCTGGGTCT	2032-2002	
pre-C, C	S	GACGAATTCCATTGACCCGTATAAAGAATT	1778-1808	(13)
	A	ATGGGATCCCTGGATGCTGGGTCTTCCAAA	2017-1987	
P, S1, S2 S, X	S	(CCGAG)CTCCACCAATCGGCAGTCAGGAAG	3140-3163	(14)
	A	(CGATC)GATTCAGCGCCGACGGACGTA	1449-1428	
P, S	S(w),	TCATCCTGGGCTTTCGGAAA	626-635	(15)
	S(adr)	TCATCCTGGGCTTTCGCAAG	626-535	
	A	(CTCAAGCTT)CATCATCCATATA	750-738	
pre-C, C X, P	S	AAGCTGTGCCTTGGGTGGCTTTA	1748-1770	(16)
	A	ATAGCTTGCCTGAGTGCTGTA	1950-1930	
pre-C, C P	S	ATGCAACTTTTTACCTCTGCC	1814-1835	(17)
	A	ATACGGGTCAATGTCCAGGGCC	1918-1897	
P, S1, S2	S	GTCACCATATCTTGG	2816-2833	(18)
	A	GTCCTAGGAATCCTGATG	187-170	
preC, C	S*	GTGCCTTGGGTGGCTTTA	1879-1896	(19)
	S	GTGCCTTGGGTGGCTTTG	1879-1896	
	A	AGTGCGAATCCCACTCC	2287-2270	
P, C	S	(CGGGATCC)GAGGAGTTGGGGGAGGAGATT	1736-1756	(20)
	A	(GAGAATTC)TCCAAGGGATACTAACATTGA	2471-2451	

Pokazano sekwencje i pozycje nukleotydowe (nt) primerów hybrydujących odpowiednio z nicią minus (S) i nicią plus (A) genomu HBV. Przedstawiono rejon genomu amplifikowany dzięki odpowiednim primerom oraz odnośniki literaturowe, z których zaczerpnięto przykłady. Primer S* służy do bezpośredniego wykrywania kodonu „stop” w rejonie pre-C, a primery S(w) i S(adr) odpowiednich podtypów HBV.

4.2. Ocena produktów amplifikacji DNA wirusa

Po amplifikacji próbki mogą być analizowane w różny sposób. Najprostszą metodą jest elektroforeza w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym z dodatkiem bromku etydyny, który umożliwia obserwację zamplifikowanego materiału w świetle *uv*. Pojawiający się prążek — produkt PCR — powinien mieć długość odpowiadającą odległości między dwoma primerami. Jest to podstawowa analiza, która potwierdza obecność sekwencji docelowej w badanym materiale. Fragmenty większe lub mniejsze mogą pojawiać się na skutek niespecyficznego łączenia pomiędzy primerami a sekwencją docelową, podwojeniu rejonów komplementarnych, nieprzewidzianych insercji lub delecji w rejonie docelowym.

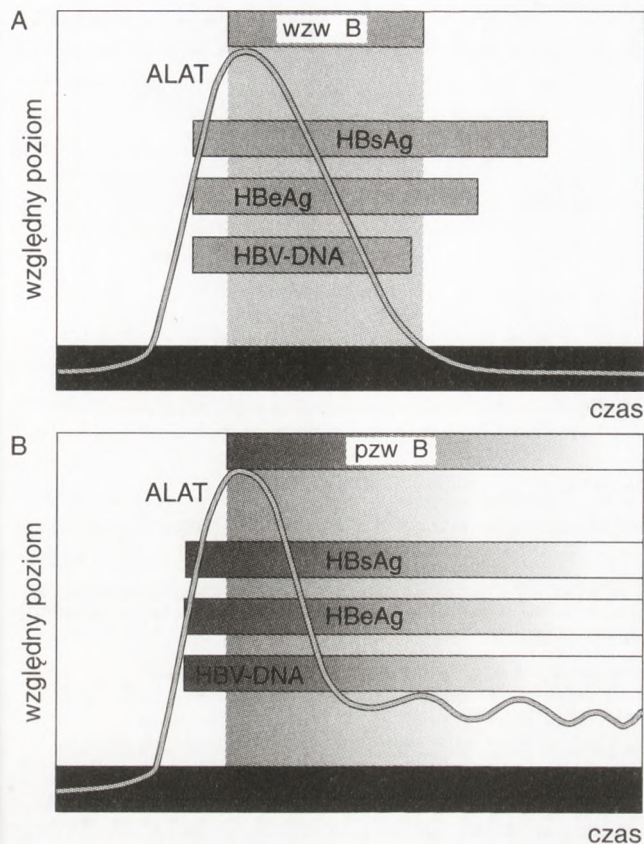
Aby zwiększyć czułość i swoistość metody PCR wprowadza się dodatkowe elementy weryfikacji, np. trawienie przy użyciu specyficznego enzymu restrykcyjnego (17), sekwencjonowanie otrzymanego materiału (19) lub też analizę z użyciem testów hybrydacyjnych (21). Bardzo skuteczną metodą jest zastosowanie podwójnej amplifikacji tzw. *nested* PCR, w której produkt pierwszej amplifikacji, uzyskany przy zastosowaniu primerów zewnętrznych, służy jako sekwencja docelowa w drugiej amplifikacji z primerami wewnętrznymi (22).

Nieco bardziej skomplikowana jest analiza produktów przy ilościowej metodzie PCR. Amplifikacja prób badanych odbywa się równolegle z amplifikacją prób zawierających znane ilości docelowego fragmentu DNA. Po PCR i *Southern blot* sygnał hybrydacyjny prób wzorcowych oznaczany jest ilościowo przez densytometr lub licznik scyntylicyjny (23). Na podstawie sporządzonej w ten sposób krzywej standardowej określa się ilość DNA w analizowanych próbach. Wysoka czułość PCR wynikająca z ekspotencjalnej amplifikacji sekwencji docelowej powoduje, że po 30-35 cyklach 100 fg wyjściowego docelowego DNA można zobaczyć produkt amplifikacji w żelu agarozowym po wybarwieniu bromkiem etydyny. Jeśli zaś produkt amplifikacji przenoszony jest na błonę nylonową i poddawany hybrydacji, limit detekcji obniża się nawet do 1000 razy osiągając 100 ag (24).

5. Kliniczne znaczenie amplifikacji w wykrywaniu DNA HBV

5.1. Przejście ostrego zapalenia wątroby w zapalenie przewlekłe

U około 10% pacjentów, którzy mają ostre zapalenie wątroby nie eliminuje się wirusa i przechodzi ono w stan przewlekłego zapalenia wątroby (rys. 3). O przewlekłości mówi się, wtedy gdy HBsAg utrzymuje się w surowicy dłużej niż 6 miesięcy, zaś HBeAg utrzymuje się ponad 12 tygodni lub też DNA HBV jest wykrywane w surowicy dłużej niż 10 tygodni. Bardzo duże znaczenie ma w tym przypadku oznaczanie DNA HBV przy udziale PCR (25). Wczesne rozpoznanie tendencji do przewlekłości jest bardzo istotne, gdyż umożliwia wcześniejsze wprowadzenie leczenia interferonem i zwiększa szanse całkowitego wyeliminowania wirusa z ustroju.

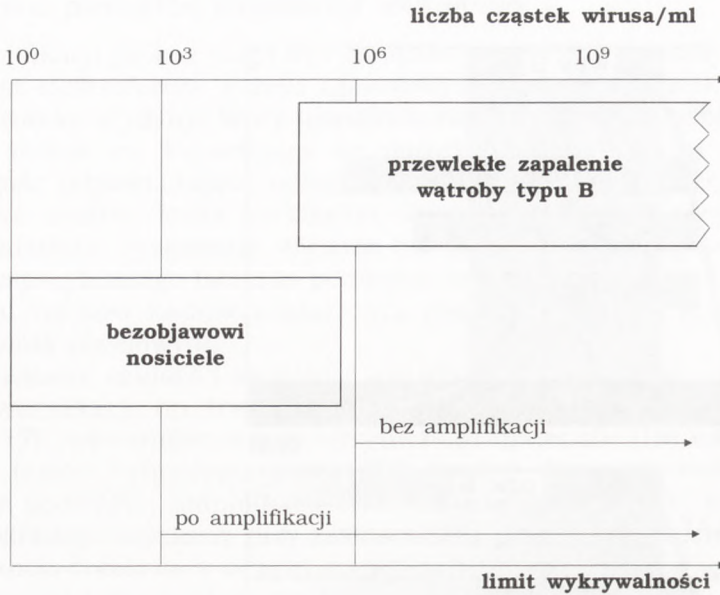


Rys. 3. Zmiany podstawowych parametrów serologicznych występujące w: (A) przebiegu ostrego zapalenia wątroby (wzw B) oraz (B) w zapaleniu przechodzącym w postać przewlekłą (pzw B).

5.2. Różnicowanie stanów nosicielstwa HBsAg

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że nosiciele HBV podzielić można na dwie grupy (26). Pierwsza charakteryzuje się podniesionym poziomem enzymów wątrobowych w surowicy oraz postępującym rozwojem choroby, są to przypadki wykazujące dodatnie wyniki w badaniu HBsAg, HBeAg i DNA HBV. U 20% tych chorych nie można wykryć DNA HBV bez amplifikacji (25).

Nosiciele należący do drugiej grupy mają normalny poziom enzymów wątrobowych, nie mają widocznych objawów chorobowych, łącznie z brakiem zmian histologicznych w wątrobie i do niedawna określani byli jako „zdrowi” nosiciele HBV. Wykazano, że 50% z tych bezobjawowych nosicieli HBsAg wykazuje obecność HBV DNA, jeśli do detekcji używa się amplifikacyjnej metody PCR. Różnica poziomów DNA HBV pomiędzy objawowymi i bezobjawowymi nosicielami HBsAg wynosić może nawet do 10^5 cząstek wirusa/ml (rys. 4).



Rys. 4. Różnice w poziomie DNA-HBV u osób z replikującą postacią przewlekłego zapalenia wątroby oraz u bezobjawowych nosicieli HBsAg.

5.3. Wykrywanie mutantów HBV

Do naturalnie występujących mutantów HBV zaliczyć można serologiczne podtypy HBsAg (d, y, w, r, q). Różnice występujące między nimi, nie mają jednak zasadniczego wpływu na przebieg kliniczny wzv B (27). W Polsce występują głównie dwa podtypy serologiczne HBV: ayw lub adw, które rozróżnić można na podstawie zastosowania metody PCR i „rodzimych” primerów (28).

Mutanty, które budzą największe zainteresowanie, gdyż w zasadniczy sposób zmieniły nasze poglądy na temat patogenezy HBV to tzw. mutanty „e-minus”, czyli nie tworzące HBeAg ze względu na mutację w rejonie pre-C (4). Najczęściej występująca mutacja to substytucja G w A w pozycji 1896, która powoduje zmianę przedostatniego kodonu w kodon „stop” i zahamowanie ekspresji HBeAg (29). Podobny efekt związany jest z mutacją w rejonie promotora genu C (30). Do czasu wykrycia tych mutacji przyjmowano, że obecność w surowicy HBeAg jest skorelowana z obecnością DNA HBV, a tym samym replikacją wirusa. Pojawianie się przeciwciał anti-HBe traktowane było jako etap, w którym zanika replikacja i dochodzi do eliminacji wirusa. Zakażenie mutantem „e-minus” charakteryzuje się obecnością w surowicy HBsAg, brakiem HBeAg, przy aktywnej replikacji HBV, o której świadczy obecność DNA HBV.

Wiadomo, że tylko oznaczanie DNA HBV jest bezpośrednim i jednoznacznym dowodem obecności HBV w organizmie.

Drugim intensywnie badanym, dzięki technice PCR, wariantem HBV jest mutant „a-minus” (20). Powoduje on rozwój zakażenia nawet u osób szczepionych, wykazujących właściwy do ochrony przed szczepem dzikim poziom przeciwciał anti-HBs. Mutacja polega na zamianie G w A w pozycji 587 i wywołuje w konsekwencji zmianę Gly w Arg w pozycji 145 (31). Powoduje to zmianę w strukturze determinanty „a” HBsAg, co pozwala wirusowi na uniknięcie neutralizacji przez indukowane przez szczepionkę przeciwciała.

Pojawianie się mutantów HBV jest wynikiem presji immunologicznej na szczep dziki.

5.4. Monitorowanie terapii interferonowej

Interferon alfa wywołujący nieswoistą aktywność antywirusową i immunoregulacyjną był w ostatnim dziesięcioleciu z powodzeniem stosowany do leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu B. Wskazaniem do terapii interferonowej jest obecność DNA HBV i HBeAg oraz podniesiony poziom enzymów wątrobowych (32). Wspomniano już, że około 20% możliwych kandydatów do leczenia nie spełnia tych kryteriów jeśli DNA HBV wykrywane jest przy zastosowaniu innej metody niż PCR (25). Amplifikacja *in vitro*, a jeszcze lepiej amplifikacja typu ilościowego jest najlepszą metodą kwalifikacji do leczenia. Niemniej istotne znaczenie ma śledzenie obecności DNA HBV w trakcie i po zakończeniu leczenia interferonem (6,33).

5.5. Wykluczanie zakaźności produktów krwiopochodnych

Metody immunochemiczne są z pewnością niewystarczające do oceny zakaźności pacjentów (34,35). U pewnej, niewielkiej grupy nosicieli HBsAg, poziom krążących, cząstek HBsAg znajduje się poniżej limitu wykrywalności. W tych przypadkach wykazuje się obecność anti-HBc i brak HBsAg, co jednak nie wyklucza zakaźności. W takiej sytuacji tylko detekcja DNA HBV przy użyciu czulej metody amplifikacji *in vitro* jest w stanie zróżnicować krew zakaźną od niezakaźnej (25).

6. Podsumowanie

Wysoka czułość i swoistość metody PCR umożliwia wykrywanie DNA HBV w próbach, które według standardów serologicznych nie powinny zawierać materiału genetycznego wirusa. Określanie obecności w surowicy HBeAg i anti-HBe nie jest, jak się okazuje, wystarczającym wykładnikiem zakaźności. Dopiero łączna interpretacja wyników badań immunoenzymatycznych i oznaczanie obecności DNA HBV metodą PCR stanowi miarodajną informację o postaci zakażenia i umożliwia właściwe postępowanie terapeutyczne (13,36).

Oprócz znaczenia diagnostycznego, użycie metody PCR miało olbrzymi wpływ na rozwój badań nad strukturą genomu HBV, przyczyniło się do wy-

krycia szeregu mutantów HBV, z których wiele ma bezpośredni wpływ na przebieg kliniczny zakażenia HBV.

Literatura

1. Tiollais P., Pourcel C., Dejean A., (1985), *Nature*, 317, 489-495.
2. Sidorkiewicz M., Plucienniczak A., (1993), *Post. Bioch.*, 39, 99-104.
3. Sidorkiewicz M., Plucienniczak A., (1994), *Post. Bioch.*, 40, 143-149.
4. Carman W. F., Jacyna M. R., Hadziyannis S., Karayiannis P., McGarvey M. J., Markis A., Thomas H.C., (1989), *Hepatology*, 2, 588-591.
5. Loch T., Cianciara J., (1992), *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 87, 345-351.
6. Sidorkiewicz M., Bednarek A., Greger J., Jabłkowski M., Białkowska J., Kuydowicz J., (1995), *Diagn. Lab., Supl.* 31, 119.
7. Yap S. F., Wong P. W., Kenneth-Raj, (1994), *Br. J. Biomed. Sci.*, 51, 336-340.
8. Barlet V., Chart M., Thelu M. A., Chaix M. J., Baccard Ch., Zarski J. P., Seigneurin J. M., (1994), *J. Virol. Meth.*, 49, 141-152.
9. Chen Ch-H., Wang J-T., Lee CH-Z., Sheu J-Ch., Wang T-H., Chen D-S., (1995), *J. Virol. Meth.*, 53, 131-137.
10. Kaneko S., Feinstone S. M., Miller R. H., (1989), *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1930-1933.
11. Saiki R., Scharf S., Falona F., Mullis K., Horn G., Erlich H. A., Arnheim N., (1985), *Science* 230, 1350-1354.
12. Kaneko S., Miller R. H., DiBisceglie A. M., Feinstone S. M., Hoofnagle S. H., Purcell R. H., (1990), *Gastroenterology*, 99, 799-804.
13. Baker B. L., DiBisceglie A. M., Kaneko S., Miller R., Feinstone S. M., Wagoner J. G., Hoofnagle J. H., (1991), *Hepatology*, 13, 632-636.
14. Blum H. E., Liang T. J., Galun E., Wands J. R., (1991), *Hepatology*, 14, 56-62.
15. Norder H., Hammas B., Lofdahl S., Courouce A-M., Magnius L. O., (1992), *J. Gen. Virol.*, 73, 1201-1208.
16. Kinoshita M., Seno T., Fukui T., Shin S., Tsubota A., Kumada H., (1994), *Clin. Chim. Acta*, 228, 83-90.
17. Nitsuma H., Ishii M., Saito Y., Miura M., Kobayashi K., Ohori H., Toyota T., (1995), *J. Med. Virol.*, 46, 397-402.
18. Nakajima E., Minami M., Ochiya P., Kagawa K., Okanou T., (1994) *J. Hepatol.*, 20, 329-335.
19. Georgen B., Meyer zum Buschenfelde K-H., Gerken G., (1994), *J. Med. Virol.*, 43, 97-102.
20. Carman W. F., Zanetti A. R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., Zuckermann A. J., Thomas H. C., (1990), *Lancet*, 336, 325-329.
21. Heermann K-H., Hagos Y., Thomssen R. (1994), *J. Virol. Meth.*, 50, 43-58.
22. Lucottwe G., Galzot P., Lu C. Y., Bathelier C., Champenois T., (1994), *Molec. Cell. Probes*, 8, 437-440.
23. Wu J., Sullivan D. E., Gerber M. A., (1994), *J. Virol. Meth.*, 49, 331-342.
24. Gerken G., Paterlini P., Manns M., Housset C., Terre S., Dienes H. P., Hess G., (1991), *Hepatology*, 13, 158-166.
25. Hess G., Rueschling M., (1993), *Clin. Biochem.*, 26, 289-293.
26. Hoofnagle J. H., Shafritz D. A., Popper H., (1987), *Hepatology*, 7, 758-763.
27. Norder H., Courouce A. M., Magnius L. O., (1992), *J. Gen. Virol.*, 73, 3141-3145.
28. Plucienniczak A., Plucienniczak G., (1994), *Zgłoszenie Patentowe P-305065*.
29. Tur-Kaspa R., Klein A., Ahranson S., (1992), *Hepatology*, 16, 1338-1342.
30. Laskus T., Rakela J., Tong M. J., Nowicki M. J., Msley J. W., Persing D. H., (1994), *J. Hepatol.*, 20, 837-841.
31. Fujii H., Moriyama K., Sakamoto N., (1992), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184, 1152-1157.
32. Hoofnagle J. H., (1990), *J. Hepatol.*, 11, 100-107.

33. Carman W. H., Dourakis S., Karayiamnnis P., Crossey M., Drobner R., Thomas H., (1991), *J. Med. Virol.*, 34, 114-118.
34. Fong T-L., Di Bisceglie A. M., Gerber M. A., Waggoner J. G., Hoofnagle J. H. (1993), *Hepatology*, 18, 1313-1318.
35. Michalak T. I., Pasquinelli C., Guilhot S., Chisari F. V., (1994), *J. Clin. Invest.*, 93, 230-239.
36. Quint W. G. V., Heijtkink R. A., Schirm J., Gerlich W. H., Niesters H. G. M., (1995), *J. Clin. Microbiol.*, 33, 225-228.

Clinical importance of PCR method for detection of hepatitis B virus DNA

Summary

Although a variety of hepatitis B marker are available to discriminate different states of hepatitis B virus (HBV) infection, there is a serious need to detect HBV DNA itself. For this reason, polymerase chain reaction (PCR), the most sensitive new technology, seems to be the best method. Indications for analysis of HBV DNA include early recognition of chronic hepatitis B, detection of HBV mutants, the study of interferon therapy results and many others.

Key words:

Hepatitis B virus, PCR, interferon therapy.

Adres do korespondencji:

Małgorzata Sidorkiewicz, I Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź.