تنوع ژنتیکی ژن S ویروس هپاتیت B در بیماران پر خطر مبتلا به عفونت نهفته HBV

آمیتیس رمضانی[۱]، رسول همکار[۲]، صفیه صوفیان[۳]، محمد بنی فضل[۴]، نبی الله ایزدی[۵]، نسترن قوامی[۶]، معصومه صوفیان[۷]، حبیب الله ناظم[۸]، مهسا نادری[۶]، فرخ لقا احمدی[۹]، عفت رازقی[۹] ، علی اسلامی فر[۱۰] و آرزو آقاخانی[۱۰*]

۱. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار انستیتو پاستور ایران
۲. دکترای ویروس شناسی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. دکترای بیوفیزیک، دانشگاه پیام نور اراک
۴. متخصص اطفال، انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور
۵. پزشک عمومی ، مرکز تحقیقات انتقال خون ایران
۶. فوق لیسانس، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
۷. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اراک
۸. دکترای بیوشیمی، دانشیار سازمان مرکزی پیام نور تهران
۹. فوق تخصص نفرولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۱۰. پاتولوژیست، استادیار انستیتو پاستور ایران

نشانی برای مکاتبه: تهران ،خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران،گروه تحقیقات بالینی، تلفن:۰۲۱۶۶۴۶۵۱۴۷، نمابر ۰۲۱۶۶۴۶۵۱۴۷،
aaghakhani@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: مرداد هشتاد و هشت پذیرش برای چاپ: مهر هشتاد و هشت

چکیده

سابقه و هدف: *عفونت نهفته ویروس هپاتیت B (Occult HBV infection) به موارد عفونت HBV با HBsAg غیر قابل شناسایی در خون اطلاق می شود. موتاسیون های ژن S در اشکال مختلف بالینی هپاتیت B گزارش شده است. از انجا که مطالعات اندکی بر روی موتاسیون های ژن S در بیماران مبتلا به عفونت نهفته HBV انجام شده است بر ان شدیم تا این موتاسیون ها را در بیماران پر خطر مبتلا به عفونت نهفته HBV بررسی نماییم.*

روش کار : *۳۹۵ بیمار شامل ۲۸۹ بیمار همودیالیزی و ۱۰۶ بیمار HIV مثبت درشهر تهران در این مطالعه وارد شدند. در کلیه بیماران anti-HBs , HBsAg ،anti-HCV و anti- HBc اندازه گیری شد. HBV-DNA در پلاسمای بیماران دارای anti-HBc ایزوله به روش real time PCR مورد بررسی قرار گرفت. در بیماران HBV-DNA مثبت ، ناحیه ژن S توسط nested PCR تکثیر شد و موتاسیون های ان با سکوانسینگ تعیین گردید.*

یافته ها: *در ۲ ایزوله insertion ، Tدر موقعیت ۶۰ و G در موقعیت ۸۹ مشاهده شد که منجر به بروز پدیده غیر عملکردی شدن (Nonfunctional) پروتئین های HBs گردید. در ۲ ایزوله premature stop codon به دلیل جایگزینی نوکلئوتید T با A در موقعیت ۴۴ و G با T در موقعیت ۲۸ مشاهده شد. جایگزینی (substitution) اسیدامینه در ۴ ایزوله دیگر مشاهده شد که این جایگزینی در موقعیت ۲۰۷ به صورت جانشینی سرین توسط اسپاراژین(S207N) بود. موتاسیونی در ناحیه determinant "a" مشاهده نگردید.*

نتیجه گیری: *این مطالعه نشان داد که موتاسیون های ناحیه determinant "a" نقش مهمی در شناسایی HBsAg بازی نمی کنند و موتاسیون های دیگری می توانند مسئول وجود عفونت نهفته HBV و عدم شناسایی HBsAg در تست های تشخیصی گردند.*

واژگان کلیدی : *موتاسیون ژن S، عفونت نهفته ویروس هپاتیت B (Occult HBV infection)*

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

عفونت با ویروس هپاتیت B(HBV) یکی از مشکلات بهداشت عمومی در سراسر جهان و عامل اصلی هپاتیت مزمن، سیروز و کارسینوم سلول کبدی (Hepatocellular Carcinoma=HCC) می باشد. تخمین زده می شود که حدود دو بیلیون نفرشواهد سرولوژیک آلودگی قدیمی یا فعلی با HBV را دارند. بیش از ۳۵۰ میلیون نفر حامل مزمن HBV می باشند و ۷۵٪ این حاملین مزمن در آسیا و غرب اقیانوس آرام زندگی می کنند(۱و۲). شیوع HBV در ایران بین ۱/۷٪ تا بیش از ۵٪ در بین استان های مختلف متغیر می باشد(۳).

به حضور hepatitis B core antibody (anti-HBc) بدون وجودHepatitis B surface antigen (HBsAg) و Hepatitis B surface antibody (anti-HBs) درسرم anti-HBc ایزوله اطلاق می شود که می تواند به عنوان نشانگر عفونت مزمن HBV مطرح باشد (۴). تعدادی از افراد دارای این وضعیت سرولوژیک، HBV-DNA در سرم داشته که می تواند عامل بالقوه انتقال HBV از طریق انتقال خون، همودیالیز ویا پیوند اعضا باشد(۸-۵).

عفونت نهفته ویروس هپاتیت B (Occult HBV infection) به موارد عفونت HBV با HBsAg غیر قابل شناسایی در خون اطلاق می شود(۹). تئوری های متعددی در مورد مکانیسم های احتمالی عدم شناسایی HBsAg در حضور ویرمیHBV در سرم مطرح می باشد از جمله موتاسیون های موجود در ناحیه S ژنوم ویروس ، کاهش viral load و حساسیت ناکافی تست های موجود برای شناسایی HBsAg (۱۰).

موتاسیون های ناحیه S ویروس هپاتیت B در سراسر جهان مشاهده می گردند ولی به طور عمده در اسیا دیده می شوند.از نقطه نظر بالینی موتانت های ناحیه S بسیار حائز اهمیت هستند. به طور طبیعی در عفونت HBV سیستم ایمنی سلولی و هومورال بر علیه پروتئین های اختصاصی ویروس وارد عمل شده و موجب پاک سازی ویروس می گردند. در حالیکه موتانت های S ویروس HBV از شناسایی توسط سیستم ایمنی فرار کرده و سبب بیماری مزمن کبدی می گردند که می تواند به سمت نارسایی کبد و یا کارسینوم پیشرفت نماید به علاوه این موتانت ها می توانند به سایرین نیز منتقل شده و باعث گسترش عفونت HBV شوند(۱۱ و۱۲). لذا واریانت های HBV از نظر شناسایی توسط سیستم ایمنی میزبان ،افزایش ویرولانس و تکثیر ویروس ،مقاومت به داروهای انتی ویرال ، تسهیل اتصال و نفوذ به سلول های کبدی و عدم شناسایی HbsAg در تست های روتین ازمایشگاهی حائز اهمیت می باشند(۱۳).

شایع ترین این موتاسیون ها به صورت جابجایی گلیسین به ارژینین در موقعیت ۱۴۵ (G145R) در ناحیه "a"determinant (اسید امینه های ۱۲۴ تا ۱۴۷) می باشد. تغییرات در اسید امینه های موقعیت های ۱۲۶ ،۱۳۱،۱۳۳، ۱۴۲، ۱۴۴،۱۴۵ و ۱۴۶ نیز در بیماران دارای عفونت نهفته HBV در سراسر جهان ذکر شد است(۱۹-۱۴).

برخی مطالعات گزارش نموده اند که موتاسیون های ناحیه "a" determinant ممکن است نقش اساسی در یافتن HBsAg نداشته و سایر موتاسیون های ژن S که منجر به ایجاد stop codon های زودرس می گردند در ترشح و یافتن HBsAg دخیل باشند(۲۲-۲۰).

از انجا که مطالعات اندکی بر روی موتاسیون های ژن S در بیماران مبتلا به عفونت نهفته HBV انجام شده است بر ان شدیم تا این موتاسیون ها را در بیماران پر خطر مبتلا به عفونت نهفته HBV بررسی نماییم.

روش کار

این مطالعه به صورت مقطعی بر روی ۳۹۵ بیمار شامل ۲۸۹ بیمار همودیالیزی و ۱۰۶ بیمار HIV مثبت در شهر تهران انجام گرفت. پس ازاخذ رضایت نامه و تکمیل فرم اطلاعاتی شامل مشخصات دموگرافیک از بیماران نمونه خون گرفته شد.

HBsAg و anti-HBs توسط روش الایزا با استفاده از کیت (Hepanostika bioMerieux, Boxtel, Netherlands) تست شدند. anti-HCV(Hepatitis C virus antibody) و anti-HBc به ترتیب با استفاده از کیت های الایزا (Biorad, Segrate, Italy) و Dia-Pro (Diagnostic, Milano, Italy))بررسی شدند. AST وALT بیماران نیز اندازه گیری شد. anti-HIV با روش الایزا (MP Biomedicals, Illkirch, France) بررسی گردید و نمونه های مثبت با روش وسترن بلات (Diaplus, San Francisco, USA) تایید شد.

برای بررسی عفونت نهفته هپاتیت HBV-DNA با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) از نمونه ها استخراج گردید و سپس توسط real time PCR با استفاده از کیت artus HBV RG PCR kit (QIAGEN, Hamburg, Germany) و دستگاه Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, real-time thermal cycler Australia) به صورت کمی تعیین شد. Analytical detection limit این کیت ۲۰IU/mlبود. HBV DNA کمتر از ۵۰ IU/ml به صورت کمتر از ۵۰ IU/ml ذکر گردید. سپس نمونه های HBV-DNA مثبت با روش Nested PCR با پرایمر های PrsS2 (Forward, nt 2820-2837, 5'-GGGACACCATATTCTTGG) و S1R (reverse, nt 842-821, 5'-TTAGGGTTTAAATGTATACCCA) بعنوان جفت پرایمرهای خارجی و پرایمرهای داخلی HBS1 (forward, nt 155-173, 5'-ATGGAGAACATCACATCAG-3') و YS2 (reverse, nt 767-787, 5'-GGGACTCAAGATGTTGTACAG) مورد بررسی قرار گرفتند. با روش Nested PCR یاد شده یک قطعه ۶۳۳bp از نوکلئوتید ۱۵۵ تا ۷۸۷ ژن S ویروس هپاتیت B تکثیر داده شد. سپس محصولاتPCR توسط کیت تخلیص محصول PCR (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) خالص شده و برای تعیین توالی (سکوانسینگ) ارسال شدند.

سکانس های بدست آمده بعد از ویرایش ابتدایی توسط برنامه Chromas در برنامه DNA Star و Bioedit و در مقایسه با سکانس پرایمرها مورد ویرایش قرار گرفتند. سپس بررسی مقایسه ای (Aligned) در مورد آنها و سکانسهای رفرانس دریافت شده از بانک ژن با استفاده از نرم افزار DNA Star و Bioedit و با روش CLUSTAL W انجام گردید. آنالیز فیلوژنیک با استفاده از نرم افزارTREECON انجام شد. فواصل ژنتیکی با استفاده از روش Kimura 2-parameter matrix با برنامه TREECON براورد شد و درخت فیلوژنیک با استفاده از روشneighbor-joining با برنامه TREECON ترسیم شد. برای اثبات اعتبار درخت فیلوژنیک bootstrap Resampling ۱۰۰۰ بار انجام گرفت. سکانس های نوکلئوتید ایزوله های HBV گزارش شده در این مقاله در بانک ژن تحت accession numbers (FJ629263-FJ629270) ثبت شدند.

یافته ها با استفاده از نرم افزار۱۶ SPSS و آزمونهای اماری t و chi-square (یا تست دقیق فیشر) تجزیه و تحلیل شد و مرز معنی داری اختلافات روی $P<0.05$ قرار داده شد. داده ها به صورت means ± standard deviations و در صورت لزوم عدد مطلق یا در صد گزارش شدند. ضریب اطمینان(CI) ۹۵٪ نیز محاسبه گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته ها

۳۹۵ بیمار شامل ۲۸۹ بیمار همودیالیزی و ۱۰۶ بیمار HIV مثبت در این مطالعه وارد شدند. میانگین سنی بیماران همودیالیزی ۱۶± ۵۵ سال بود. ۶۰٪ بیماران مرد و ۴۰٪ انها زن بودند. مدت زمان دیالیز در این بیماران ۵/۱ ±۵/۲ سال بود. anti-HCV ، HBsAg ، anti-HBs و anti-HIV به ترتیب در۳/۱٪، ۲/۸٪ ، ۷۷/۵٪ و ۰/۳۴٪ بیماران مثبت بودند. میانگین انزیم های کبدی AST و ALT به ترتیبIU/l ±۹/۸ ۱۶/۹ و۹/۴± ۱۶/۴ بود.

میانگین سنی بیماران HIV مثبت۹/۶± ۳۶/۶سال بود.۷۴/۵٪ انها مرد و ۲۵/۵٪ زن بودند. میانگین سلول های CD4 بیماران$cells/mm^3$ (۹۴۰-۲)۳۴۹/۰۸±۱۸۱/۰۷ بود. میزان عفونت همزمانHIV با ویروس هپاتیت C ۶۷٪ و با ویروس هپاتیت B ۳/۸٪ بود. میانگین $\log_{10}$ HIV Viral load بیماران ۱/۹۷±۲/۰۳ بود. میانگین انزیم کبدیALT , IU/L ۳۲/۴ ±۲۰/۱ بود.

شایع ترین راه احتمالی انتقال HIV در بیماران تزریق مواد مخدر۵۲/۸٪ و انتقال از همسر الوده۲۴/۵٪ بود.

از ۳۹۵ بیمار ۴۰ نفر (۱۸ بیمار همودیالیزی و ۲۲ بیمار HIV مثبت) دارای anti-HBc ایزوله بودند (۱۳/۱-۷/۱٪ ,CI ۹۵٪، ۱۰/۱۳٪).

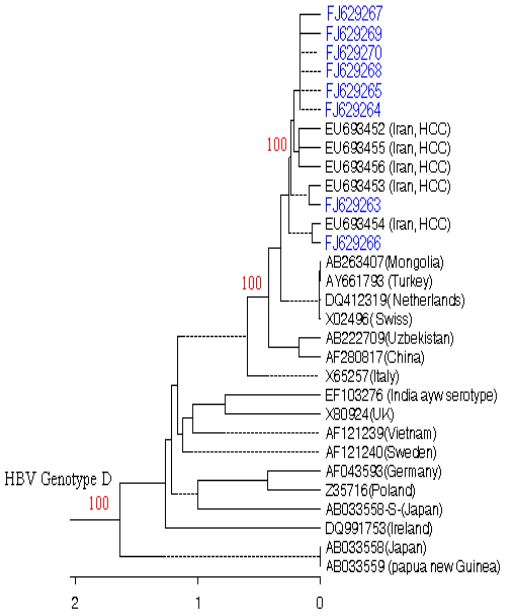
HBV-DNA در ۱۲ بیمار از ۴۰ بیمار (۴۴/۲-۱۵/۸٪ ,CI ۹۵٪، ۳۰٪) دارایanti-HBc ایزوله شناسایی شد. از این ۱۲ بیمار ۹ نفر همودیالیزی و ۳ نفر HIV مثبت بودند. میزان HBV-DNA در تمام این بیماران کمتر از ۵۰IU/ml بود.

در ۸ بیمار شامل ۵ بیمار همودیالیزی و ۳ بیمار HIV مثبت، ژنوتیپ HBV و موتاسیون های ژن S به روش sequencing بررسی شد. ژنوتیپ کلیه ایزوله ها D گزارش گردید (شکل ۱).

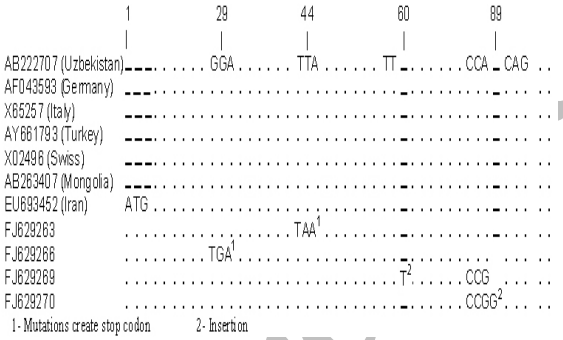
در ۲ ایزوله insertion ، Tدر موقعیت ۶۰ و G در موقعیت ۸۹ مشاهده شد که پدیده غیرعملکردی (Nonfunctional) پروتئین های HBs را در پی داشت. در ۲ ایزوله premature stop codon به دلیل جایگزینی نوکلئوتید T با A در موقعیت ۴۴ و G با T در موقعیت ۲۸ مشاهده شد(شکل ۲). به عبارتی دیگرTTA→TAA stop mutation منجر به ایجاد stop codon های زودرس در موقعیت لوسین ۱۵ و GGA→TGA سبب stop codon زودرس در گلیسین ۱۰ ژن S ویروس هپاتیت B گردید.

جایگزینی(substitution) اسیدامینه در ۴ ایزوله دیگر مشاهده شد که این جایگزینی در موقعیت ۲۰۷ به صورت جانشینی سرین توسط اسپاراژین(S207N) بود (شکل۳).

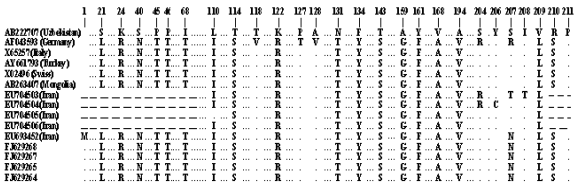
شکل ۱ درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از روش neighbor-joining با برنامه TREECON



شکل ۲. موقعیت stop codon ها و جایگزینی نوکلئوتیدهای منفرد که موجب ایجاد HBsAg نان فانکشنال گردیده اند.



شکل ۳. جایگزینی(substitution) اسیدامینه در موقعیت ۲۰۷ به صورت جانشینی سرین توسط اسپاراژین(S207N)



Archive of SID
www.SID.ir

بحث

در این مطالعه موتاسیون های ژن S و ژنوتیپ ویروس هپاتیت B در بیماران پر خطر مبتلا به عفونت نهفته HBV بررسی گردید. اطلاعات محدودی در زمینه ژنوتیپ HBV در مبتلایان به عفونت نهفته وجود دارد. مطالعه ما نشان داد که همه ایزوله های HBV مبتلایان به عفونت نهفته HBV ژنوتیپD هستند که با سایر مطالعات در این خصوص تطبیق می کند و تایید می نماید که ژنوتیپD تنها ژنوتیپ قابل شناسایی در اشکال بالینی مختلف HBV در ایران می باشد. در این مطالعه مهم ترین موتاسیون ها که سبب بدون عملکرد ماندن (Nonfunctional) HBsAg گردید insertion نوکلئوتید منفرد در ۲ بیمار بود که موجب frame shift و جایگزینی یک نوکلئوتید جدید شد. stop codon پره ماچور نیز در موقعیت Leu15 وGly10 در ۲ بیمار دیگر مشاهده شد که منجر به عدم شناسایی HBsAg در تست های روتین ازمایشگاهی تشخیصی گردید. موتاسیون S207N نیز در ژن S چهار بیمار تعیین شد ولی موتاسیونی در ناحیه "a" determinant مشاهده نگردید.

چندین سال است که موتاسیون های HBV که با تشخیصHbsAg در روش های سرولوژیک تداخل می کنند شناخته شده اند(۲۰). بسیاری از این موتاسیون ها ناحیه a ژن S را تحت تاثیر قرار می دهند که شایع ترین انها G145R می باشد. سایر موتاسیون های تاثیر گذار جایگزینی بقایای سیستئین در موقعیت های ۱۲۱ ،۱۲۴،۱۳۷ و ۱۴۷ می باشد (۲۱،۲۳). در بیماران مبتلا به عفونت نهفته HBV جایگزینی ۲ تا ۸ اسید امینه بین موقعیت های ۱۲۱ و ۱۲۴ گزارش شده است. همچنین برخی مطالعات موتاسیون های missense در ناحیه "a" determinant را در بیماران مبتلا به عفونت نهفته HBV در اروپا ، اسیا و افریقا گزارش کردند (۲۴،۲۵).

مطالعات اخیر پیشنهاد می کنند که ممکن است موتاسیون های ناحیه a نقش اساسی در یافتن HbsAg و تشخیص عفونت نهفته نداشته باشند (۲۰) و موتاسیون های جدید در ژن S که منجر به premature termination ژن S می گردند در عدم تشخیص HbsAg در روش های سرولوژیک موثر باشند(۲۱،۲۲).

در مطالعه ای که در بیماران الوده به HIV در برزیل انجام شد stop codon در موقعیت ۲۱۶ مشاهده شد(۲۶). Datta و همکارانش در مطالعه ای بر روی اهداکنندگان خون دارای عفونت نهفته HBV موتاسیون نقطه ای (T-A) در موقعیت نوکلئوتید ۲۰۷ ژن S مشاهده کردند که منجر به stop codon در اسید امینه موقعیت ۶۹ گردید(۲۷). Yang و همکارانش نیز stop codon در ژن S یافتند که سبب موتاسیون نقطه ای در Upstream ناحیهdeterminant "a" ژن S گشته بود(۲۸).

بهر حال همه بیماران دارای عفونت نهفته HBV موتاسیون در ناحیه "a" determinant ندارند و عوامل دیگری ممکن است مسئول عدم شناسایی HBsAg در سرم باشند.چنین عوامل شامل موتاسیون های خارج ناحیهdeterminant "a" (۱۴،۲۱) ، ژنوتیپ ویروس و تکثیر ویروس در سطوح پایین می باشد (۲۰).

در مطالعه ای که بر روی ۲۴۹ بیمار الوده به HBV در ۲۵ استان ایران انجام شد، شایع ترین موتاسیون ها Ser143Leu, Ile10Leu, Gln101Arg, Pro120Ser, Thr118Ala, Ser136Tyrو Thr118Lys بودند. یک ایزوله نیز جایگزینی ۱۵ نوکلئوتید را بین نوکلئوتیدهای ۲۲۲ و ۲۲۳ نشان داد. TGG →TGA stop mutationدر ۲ ایزوله دیگر گزارش شد که منجر به stop codon زودرس در موقعیت Trp172 ژن S گردید(۲۹). مطالعه ما که بر روی موتاسیون های ناحیه S ایزوله های HBV جدا شده از بیماران دارای عفونت نهفته HBV انجام گرفت هیچ یک از موتاسیون های فوق الذکر را که در بیماران ایرانی مبتلا به سایر اشکال عفونت های بالینی HBV مشاهده گردیده بودند را نشان نداد.

نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که مانند سایر اشکال بالینی HBV ، ژنوتیپ D تنها ژنوتیپ موجود در بیماران ایرانی مبتلا به عفونت نهفته HBV می باشد و حضور عفونت نهفته HBV بین افراد دارای anti-HBc ایزوله توسط موتاسیون های ناحیه "a" determinant به تنهایی توجیه نمی گردد و سایر موتاسیون ها می توانند مسئول وجود عفونت نهفته HBV و عدم شناسایی HBsAg در تست های تشخیصی گردند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور و دانشگاه پیام نور اراک به جهت حمایت مالی از طرح فوق قدردانی می نمایند.

REFERENCES

1. Hepatitis B: World Health Organization Fact Sheet 204. 2000: World Health Organization. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/

2. Gust ID. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. Gut 1996; 38 (suppl 2):S18-S23

3. Merat S, Malekzadeh R, Rezvan H, Khatibian M. Hepatitis B in Iran. Arch Iran Med 2000; 3: 192–201.

4. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gunther S, et al. Serological pattern ‘‘anti-HBc alone’’ Report on a workshop. J Med Virol 2000; 62:450–455.

Archive of SID
www.SID.ir

5. Zhang YY, Nordenfelt E, Hansson BG. Increasing heterogeneity of the 'a' determinant of HBsAg found in the presumed late phase of chronic hepatitis B virus infection. Scand J Infect Dis 1996; 28: 9-15

6. Liang TJ, Baruch Y, Ben-Porath E, Enat R, Bassan L, Brown NV, et al. Hepatitis B virus infection in patients with idiopathic liver disease. Hepatology 1991; 13: 1044-1051

7. Chung HT, Lai CL, Lok AS. Pathogenic role of hepatitis B virus in hepatitis B surface antigen-negative decompensated cirrhosis. Hepatology 1995; 22: 25-29

8. Paterlini P, Gerken G, Nakajima E, Terre S, D'Errico A, Grigioni W, et al. Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis B surface antigen. N Engl J Med 1990; 323: 80-85

9. Hu K. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implication. J Viral Hepat. 2002; 9(4):243-57

10. Kaviani MJ, Behbahani B, Mosallaii MJ, Sari-Aslani F, Taghavi SA. Occult hepatitis B virus infection and cryptogenic chronic hepatitis in an area with intermediate prevalence of HBV infection. World J Gastroenterol. 2006 ;12(31):5048-50

11. Liu CJ, Kao JH, Shau WY, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Naturally occurring hepatitis B surface gene variants in chronic hepatitis B virus infection: correlation with viral serotypes and clinical stages of liver disease. J Med Virol. 2002 Sep;68(1):50-9

12. Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. Hepatology 2000; 31:1037–1044.

13. Ozaslan M, Ozaslan E, Barsgan A, Koruk M. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Turkish patients. J Genet. 2007;86(3):195-201

14. Pichoud C, Seigneres B, Wang ZR, Trep C, Zoulim F. Transient selection of a hepatitis B virus polymerase gene mutant associated with a decreased replication capacity and famciclovir resistance. Hepatology 1999; 29:230-237.

15. Harrison TJ, Hopes EA, Oon CJ, Zanetti AR, Zuckerman AJ. Independent emergence of a vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. J Hepatol 1991; 13(Suppl 4):S105-S107.

16. Carman WF, Korula J, Wallace L, MacPhee R,MimmsL, Decker R. Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. Lancet 1995; 345:1406-1407

17. Moriyama K, Nakajima E, Hohjoh H, Asayama R, Okochi K. Immunoselected hepatitis B virus mutant. Lancet 1991; 337:125.

18. Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, et al. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. J Virol 1994; 68:2671-2676.

19. Kato J, Hasegawa K, Torii N, Yamauchi K, Hayashi N. A molecular analysis of viral persistence in surface antigen–negative chronic hepatitis B. Hepatology 1996; 23:389-395.

20. Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, Jilg W. 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. 2000;81(Pt 5):1165-74

Archive of SID

www.SID.ir

21. Grethe S, Monazahian M, Bohme I, Thomssen R. Characterization of unusual escape variants of hepatitis B virus isolated from hepatitis B surface antigen-negative subjects. J Virol 1998;72:7692-6

22. Wakil SM, Kazim SN, Khan LA, Raisuddin S, Parvez MK, Guptan RC, et al. Prevalence and profile of mutations associated with lamivudine therapy in Indian patients with chronic hepatitis B in the surface and polymerase genes of hepatitis B virus. J Med Virol. 2002; 68(3):311-8

23. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Yamashiro T, Maeshiro T, et al. Hepatitis B virus concentrations in serum determined by sensitive quantitative assays in patients with established chronic hepatitis delta virus infection. J Med Virol 2001;65:478-84

24. Ireland JH, O'Donnell B, Basuni AA, Kean JD, Wallace LA, Lau GK, et al. Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. Hepatology 2000; 31: 1176-1182.

25. Seddigh-Tonekaboni S, Waters JA, Jeffers S, Gehrke R, Ofenloch B, Horsch A, et al. Effect of variation in the common "a" determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen. J Med Virol 2000; 60:113-121.

26. Araujo NM, Branco-Vieira M, Silva AC, Pilotto JH, Grinsztejn B, de Almeida AJ, et al. Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients: Evaluation of biochemical, virological and molecular parameters. Hepatol Res. 2008 ;38(12):1194-203

27. Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Chakraborty S, Basu SK, Chakravarty R. Detection of a premature stop codon in the surface gene of hepatitis B virus from an HBsAg and antiHBc negative blood donor. J Clin Virol. 2007;40(3):255-8

28. Yang X, Tang XP, Lei JH, Luo HY, Zhang YH. Novel stop codon mutation in HBsAg gene identified in a hepatitis B virus strain associated with cryptogenic cirrhosis. World J Gastroenterol. 2003;9(7):1516-20

29. Mohebbi SR, Amini-Bavil-Olyaee S, Zali N, Noorinayer B, Derakhshan F, Chiani M, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Iran. Clin Microbiol Infect. 2008;14(9):858-66

Archive of SID

www.SID.ir