

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

آمیثیس رضانی^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
پذیرش برای چاپ: مهر هشتاد و هشت دریافت مقاله: مرداد 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 آنجا که مطالعات اندکی بر روی موتاسیون های ژن S در بیماران مبتلا به عفونت نهفته HBV انجام شده است بر آن 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 در شهر تهران در این مطالعه وارد شدند. در کلیه بیماران *anti-HBsAg*، *anti-HCV*، *anti-HBc* 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 آن با سکوانسینگ تعیین گردید.

یافته ها: در ۲ ایزوله *insertion*، T در 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*) اسید آمینه در ۴ ایزوله دیگر مشاهده شد که این جایگزینی در موقعیت ۲۰۷ به صورت جانشینی سرین توسط اسپارژین (S207N) بود. موتاسیونی در ناحیه "a" determinant مشاهده نگردید.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که موتاسیون های ناحیه "a" determinant 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*)

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 نفر شواهد 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 (۱ و ۲). شیوع HBV در ایران بین ۱۷٪ تا بیش از ۵٪ در بین استان های مختلف متغیر می باشد (۳).

به حضور (anti-HBc) hepatitis B core antibody بدون وجود Hepatitis B surface antigen (HBsAg) و Hepatitis B surface antibody (anti-HBs) در سرم 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 و یا 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 ویروس HBV 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 آسیا 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 و ۱۲). لذا واریانت های HBV از نظر شناسایی توسط سیستم ایمنی میزبان، افزایش ویروانسانس و تکثیر ویروس، مقاومت به داروهای انتی ویرال ، تسهیل اتصال و نفوذ به سلول های کبدی و عدم شناسایی HbsAg در تست های روتین آزمایشگاهی حائز اهمیت می باشند (۱۳).

شایع ترین این موتاسیون ها به صورت جابجایی گلیسین به آرژنین در موقعیت ۱۴۵ (G145R) در ناحیه "a" determinant (اسید آمینه های ۱۲۴ تا ۱۴۷) می باشد. تغییرات در اسید آمینه 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 آنجا که مطالعات اندکی بر روی موتاسیون های ژن S در بیماران مبتلا به عفونت نهفته HBV انجام شده است بر آن 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 از اخذ 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. استفاده از کیت های الایزا (Biorad, Segrate, Italy) و Dia-Pro (Diagnostic, Milano, Italy) بررسی شدند. ALT و AST 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 artus HBV RG PCR kit (Qiagen, Hamburg, Germany) و دستگاه Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, real-time thermal cycler Analytical detection limit) به صورت کمی تعیین شد. این کیت ۲۰ IU/ml بود. 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 5'-PrsS2 (Forward, nt 2820-2837, 5'-GGGACACCATATTCTTGG) S1R (reverse, nt 842- و 5'-TTAGGGTTTAAATGTATACCA) بعنوان جفت پرایمرهای خارجی و پرایمرهای داخلی ، HBS1 (forward, nt 155-173, 3'-ATGGAGAACATCACATCAG-5') و YS2 (reverse, nt 767-787, 5'-GGGACTCAAGATGTTGTACAG) مورد بررسی قرار گرفتند. با روش Nested PCR یک قطعه ۶۳۳bp از نوکلئوتید ۱۵۵ تا ۷۸۷ ژن S ویروس هپاتیت B تکثیر داده شد. سپس محصولات PCR 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 و برنامه DNA Star 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 افزار TREECON انجام شد. فواصل ژنتیکی با استفاده از روش Kimura 2-parameter matrix با برنامه TREECON برآورد شد و درخت فیلوژنیک با استفاده از روش neighbor-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 افزار SPSS ۱۶ 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 $\text{means} \pm \text{standard deviations}$ و در صورت لزوم عدد مطلق یا در صد گزارش شدند. ضریب اطمینان (CI) ۹۵٪ نیز محاسبه گردید.

یافته ها

۳۹۵ بیمار شامل ۲۸۹ بیمار همودیالیزی و ۱۰۶ بیمار HIV مثبت در این مطالعه وارد شدند. میانگین سنی بیماران همودیالیزی 55 ± 16 سال بود. ۶۰٪ بیماران مرد و ۴۰٪ آنها زن بودند. مدت زمان دیالیز در این بیماران $5/1 \pm 5/2$ سال بود. anti-HBs ، HBsAg ، anti-HCV ، anti-HIV به ترتیب در ۳/۱٪ ، ۲/۸٪ ، ۷۷/۵٪ و ۳۴/۰٪ بیماران مثبت بودند. میانگین انزیم های کبدی AST و ALT به ترتیب $16/9 \pm 9/4$ و $16/4 \pm 9/4$ بود.

میانگین سنی بیماران HIV مثبت $36/6 \pm 9/6$ سال بود. ۷۴/۵٪ آنها مرد و ۲۵/۵٪ زن بودند. میانگین سلول های CD4 بیماران $349/08 \pm 181/07$ (۲-۹۴۰) با ویروس هپاتیت C $67/0$ ٪ و با ویروس هپاتیت B $37/8$ ٪ بود. میانگین log_{10} HIV Viral load بیماران $1/97 \pm 2/03$ بود. میانگین انزیم کبدی ALT ، $32/4 \pm 20/1$ IU/L بود.

شایع ترین راه احتمالی انتقال HIV در بیماران تزریق مواد مخدر $52/8$ ٪ و انتقال از همسر الوده $24/5$ ٪ بود.

از ۳۹۵ بیمار ۴۰ نفر (۱۸ بیمار همودیالیزی و ۲۲ بیمار HIV مثبت) دارای anti-HBc ایزوله بودند ($13/1$ ٪ CI ، $7/1$ ٪ - $13/1$ ٪).

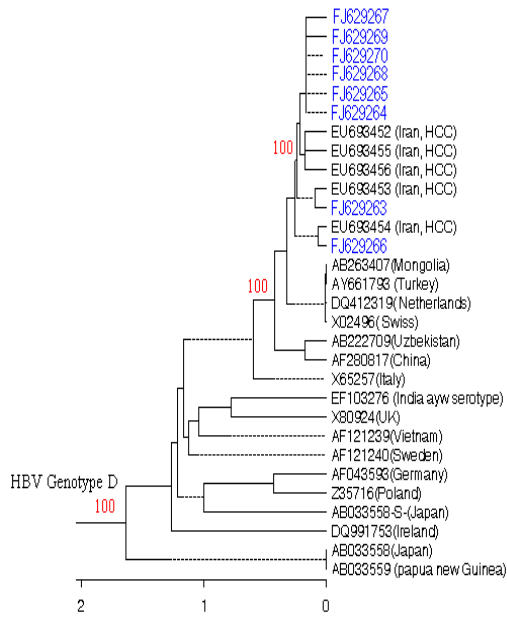
HBV-DNA در ۱۲ بیمار از ۴۰ بیمار (30 ٪ CI ، $9/5$ ٪ - 30 ٪) دارای anti-HBc ایزوله شناسایی شد. از این ۱۲ بیمار ۹ نفر همودیالیزی و ۳ نفر HIV مثبت بودند. میزان HBV-DNA در تمام این بیماران کمتر از 50 IU/ml بود.

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).

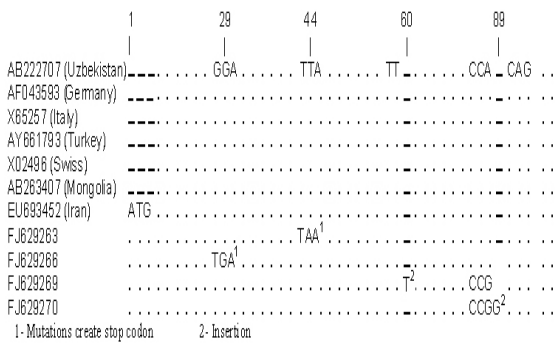
در ۲ ایزوله insertion ، T در موقعیت ۶۰ و G در موقعیت ۸۹ مشاهده شد که پدیده غیرعملکردی (Nonfunctional) پروتئین های HBs را در پی داشت. در ۲ ایزوله premature stop codon به دلیل جایگزینی نوکلئوتید T با A در موقعیت ۴۴ و G با T در موقعیت ۲۸ مشاهده شد (شکل ۲). به عبارتی دیگر $TTA \rightarrow TAA$ stop mutation و منجر به ایجاد stop codon های زودرس در موقعیت لوسین ۱۵ و $GGA \rightarrow TGA$ 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 (شکل ۳).

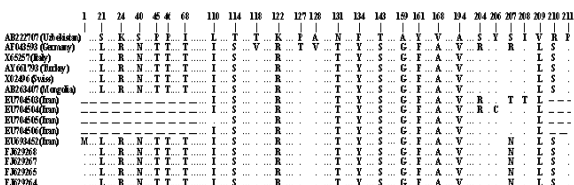
شکل ۱ درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از روش neighbor-joining با برنامه TREECON



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)



بحث

کردند که منجر به stop codon در اسید آمینه موقعیت ۶۹ گردید (۲۷). Yang و همکارانش نیز stop codon در ژن S یافتند که سبب موتاسیون نقطه ای در ناحیه "a" determinant 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 ناحیه "a" determinant (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, Ser136Tyr و Thr118Lys بودند. یک ایزوله نیز جایگزینی ۱۵ نوکلئوتید را بین TGG → TGA stop نشان داد. ۲۲۳ و ۲۲۲ mutation در 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.

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 ژنوتیپ D هستند که با سایر مطالعات در این خصوص تطبیق می کند و تایید می نماید که ژنوتیپ D 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 ماچور نیز در موقعیت Leu15 و Gly10 در ۲ بیمار دیگر مشاهده شد که منجر به عدم شناسایی HBsAg در تست های روتین آزمایشگاهی 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 تشخیص HbsAg 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 آنها G145R می باشد. سایر موتاسیون های تاثیر گذار جایگزینی بقایای سیستئین در موقعیت های ۱۲۱، ۱۳۷، ۱۳۴ و ۱۴۷ می باشد (۲۱، ۲۳). در بیماران مبتلا به عفونت نهفته HBV جایگزینی ۲ تا ۸ اسید آمینه بین موقعیت های ۱۲۱ و ۱۳۴ گزارش شده است. همچنین برخی مطالعات موتاسیون های missense در ناحیه "a" determinant را در بیماران مبتلا به عفونت نهفته HBV در اروپا ، آسیا و آفریقا 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

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.

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, Mosallai 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, Seignerès 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, Mimms L, 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

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. *Hepato 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-Olyae 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