

Study of HBsAg escape mutations in chronic hepatitis B patients under treatment with nucleos(t)ide analogues

Mahinrousta S(M.Sc)¹, Sharafi H(M.Sc)², Alavian SM(M.D)³, Behnava B(M.D)³, Pouryasir A(Ph.D)^{4*}

1- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

2- Department of Hematology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Baqiyatallah Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Department of Genetics, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran

Received: 6 Jan 2012, Accepted: 5 May 2012

Abstract

Background: Nucleos(t)ide analogues, such as lamivudine and adefovir, are effective drugs for treatment of hepatitis B patients. However, long-term treatment with these drugs leads to the emergence of the nucleos(t)ide analogue resistant strains. The impact of nucleos(t)ide analogues on the emergence of HBsAg escape mutations is not clarified. Hence, the aim of this study was to determine HBsAg escape mutations in chronic hepatitis B patients treated with nucleos(t)ide analogues.

Materials and Methods: A cross-sectional study was performed on 50 patients with chronic hepatitis B under treatment with nucleos(t)ide analogues (lamivudine and/or adefovir) and 50 naïve chronic hepatitis B patients. HBV DNA was extracted from plasma and S gene of virus was amplified by Nested-PCR followed by direct sequencing. HBsAg gene sequence of the samples was evaluated for detection of HBsAg escape mutations.

Results: Among the 100 patients, the following HBsAg escape mutations were identified: sQ101H, sG119R, sP120S, sP127S, sA128V, sG130N, sG130R, sT131I, sM133I, and sY134N. The frequency of HBsAg escape mutations in patients under treatment of nucleos(t)ide analogues was 16% and in naïve patients was 6% ($p=0.2$, $OR=2.98$).

Conclusion: According to the obtained results, there seems to be no association between using nucleos(t)ide analogues and emergence of HBsAg escape mutations.

Keywords: Adefovir dipivoxil, Chronic hepatitis B, HBsAg escape mutation, Lamivudine

*Corresponding author:

Address: No. 155, Ghaem Magham Farahani Street, Tehran, Iran

Email: Pouryasir@iaua.ac.ir

بررسی جهش‌های گریز HBsAg در بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن تحت درمان با آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی

سپیده مهین روستا¹، حیدر شرفی²، سید مؤید علویان³، بیتا بهنوا⁴، علی پوریاسین^{5*}

1- کارشناس ارشد، گروه میکروپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

2- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

3- استاد، مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)، تهران، ایران

4- استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (ع)، تهران، ایران

5- استادیار، گروه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران

تاریخ دریافت: 91/10/17 تاریخ پذیرش: 91/2/16

چکیده

زمینه و هدف: آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی از جمله لامیوودین و آدفویر داروهای موثر برای درمان بیماران هپاتیت B به شمار می‌روند ولی استفاده طولانی مدت این دسته از داروها منجر به پیدایش واریته‌های مقاوم به درمان می‌شود. از آنجائی که اثر آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی بر پیدایش واریته‌های حاوی جهش‌های گریز HBsAg به خوبی مشخص نشده است، هدف از این مطالعه بررسی جهش‌های گریز HBsAg در بیماران هپاتیت B مزمن تحت درمان با آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، 50 بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن که تحت درمان با آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی (لامیوودین و/یا آدفویر) بوده‌اند و 50 بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن که هیچ داروی ضد ویروسی دریافت نکرده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. DNA ویروس هپاتیت B از پلاسمای بیماران استخراج و قسمتی از ژن S ویروس هپاتیت B توسط روش Nested-PCR تکثیر گردید. محصول PCR توسط روش توالی یابی مستقیم از نظر وجود جهش‌های گریز HBsAg مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در کل 100 بیمار مورد مطالعه، جهش‌های گریز HBsAg دیده شده عبارتند از: sG119R، sQ101H، sY134N و sM133I، sT131I، sG130R، sG130N، sA128V، sP127S، sP120S در گروه بیماران تحت درمان با آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی 16 درصد بیماران واجد ویروس حاوی جهش‌های گریز HBsAg بودند در حالی که در بیمارانی که تحت درمان دارویی قرار نگرفته بودند 6 درصد بیماران واجد ویروس حاوی جهش‌های گریز HBsAg بودند ($p=0/2$ ، $OR=2/98$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه به نظر می‌رسد بین مصرف آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی و پیدایش جهش‌های گریز HBsAg رابطه‌ای وجود ندارد.

واژگان کلیدی: آدفویر دیپی وکسیل، هپاتیت B مزمن، جهش گریز HBsAg، لامیوودین

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان قائم مقام فراهانی، پلاک 155، ساختمان پزشکان 183

Email: Pouryasini@iaua.ac.ir

مقدمه

عفونت هپاتیت B مزمن به عنوان یک مشکل بزرگ پزشکی مطرح می باشد. آمارهای جهانی نشان داده که 360 میلیون نفر از عفونت مزمن ویروس هپاتیت B رنج می برند و بیش از 520/000 نفر هر ساله به خاطر درگیری با این ویروس جان خود را از دست می دهند (470/000 نفر به خاطر سرطان کبد و 50/000 نفر به خاطر هپاتیت B حاد) (1). با وجود این که واکسن موثر برای ویروس هپاتیت B وجود دارد، هنوز درمان قطعی برای بیماران مبتلا به این ویروس مطرح نگردیده است. ژنوم این ویروس از زنجیره مضاعف (ds DNA) حلقوی تشکیل شده که دارای 4 ژن C، S، X و P می باشد که هفت پلی پپتید را کد می کنند. ژن S ویروس هپاتیت B مسئول بیان آنتی ژن سطحی ویروس (HBsAg) بوده و دربرگیرنده ناحیه هیدروفولیک اصلی از اسید آمینه 124 الی 147 به نام determinant "a" می باشد (2).

جهش در HBsAg به ویژه ناحیه کد کننده "a" determinant باعث تنوع ژنتیکی در ویروس هپاتیت B می شود و با توجه به این که این منطقه هدف اولیه و اصلی برای سیستم ایمنی به حساب می آید، پدیدار شدن این جهش ها موجب فرار ویروس از سیستم ایمنی میزبان می شود که تحت نام جهش های گریز HBsAg مطرح می باشد (3). جهش های گریز HBsAg قابل اهمیت و بررسی می باشند، زیرا حضور این جهش ها منجر به فرار ویروس از سیستم ایمنی (Immune-escape)، فرار ویروس از واکسن (Vaccine-escape) و HBsAg منفی کاذب (Detection-escape) می شوند (3). گزارش هایی مبنی بر وجود بعضی بیماران با HBsAg منفی ولی (HBV) PCR DNA مثبت ارائه شده که علت اصلی آن جهش و تنوعی است که منجر به تغییرات در سطح ژن S و متعاقب آن تنوع در HBsAg می شود و ردیابی ویروس را در نمونه سرم بیماران مختل می نماید (4-8) و برای پزشکان یک جواب منفی کاذب به همراه دارد (9، 10). درمان بیماران هپاتیت B مزمن در دو دسته قرار می گیرد، دسته اول ایمنو

مودولاتورها شامل اینترفرون و پگ اینترفرون و دسته دوم آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی که شامل لامیوودین، آدفویر، تنفویر، انتکاویر و تلبیوودین می باشد (11). بعد از لامیوودین، آدفویر به عنوان داروی موثر برای درمان هپاتیت B رواج پیدا کرد. آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی با مهار فعالیت آنزیم پلی مرز و ویروس، تکثیر ویروس را مهار می کنند. استفاده از آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی به دلیل وجود پاسخ مناسب ضد ویروسی گام بزرگی در درمان بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن محسوب می شود اما اعمال فشار و تنش داروهای نامبرده روی ژنوم ویروس منجر به تنوع ژنتیکی و در پی آن پدیدار شدن جهش های مقاومت دارویی می شود (12). از آنجائی که اثر آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی بر روی انتخاب سویه های حاوی جهش های گریز HBsAg به خوبی مشخص نشده است، هدف این مطالعه بررسی اثر آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی بر انتخاب سویه های حاوی جهش های گریز HBsAg می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه مقطعی که از پاییز سال 1389 تا پاییز 1390 به طول انجامید، 50 بیمار مبتلا به هپاتیت B مزمن که حداقل 6 ماه و حداکثر 7 سال تحت درمان با آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی بوده اند و همچنین 50 بیمار هپاتیت B مزمن که هیچ درمانی برای هپاتیت B مزمن دریافت نکرده بوده اند، مورد بررسی قرار گرفتند. DNA ویروسی از 200 میکرولیتر نمونه پلاسمای بیماران با استفاده از کیت (Qiagen, Hilden, Germany) QIAamp® DNA Blood Mini Kit استخراج گردید. به منظور بررسی جهش های گریز HBsAg، ناحیه ای از ژن S به وسیله روش Nested-PCR تکثیر گردید. ابتدا پرایمرهای اختصاصی بیرونی از ژن مورد نظر و سپس پرایمرهای اختصاصی درونی طراحی شده و توسط شرکت سیناکلون ساخته شد. توالی پرایمرهای طراحی شده عبارت بودند از:

	30 ثانیه	94	واسرشت
35	40 ثانیه	60	اتصال
	1 دقیقه	72	بازآرایی
1	5 دقیقه	72	بازآرایی نهایی

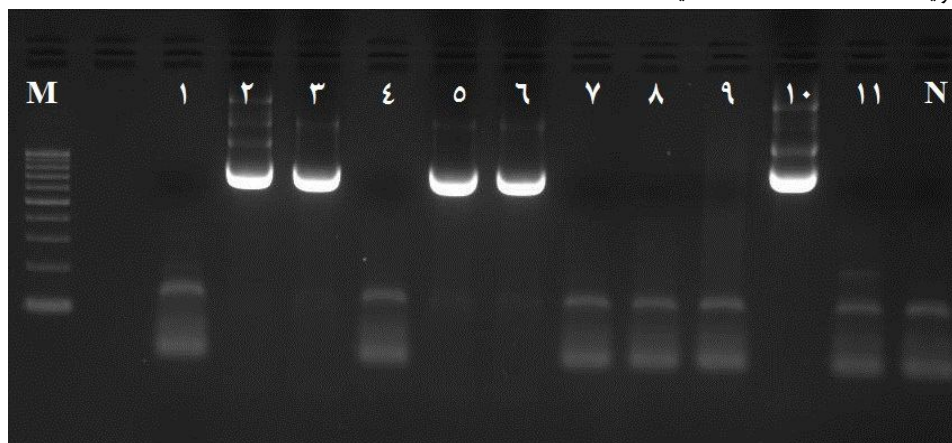
حضور قطعه 836 جفت بازی نشان دهنده صحت انجام PCR بوده است (شکل 1). سپس قطعه تکثیر شده از ژن S ویروس توسط پرایمر HBR-I-R مستقیماً توالی یابی گردید. توالی یابی محصول PCR توسط کیت و دستگاه توالی یاب (Foster City, CA, USA) ABI صورت گرفت. نتایج توالی نوکلئوتیدی توسط نرم افزار تحت شبکه geno2pheno (13) و هم چنین به صورت دستی توسط نرم افزار CLC Sequence viewer مورد بررسی قرار گرفت. در روش دستی بعد از ترجمه توالی نوکلئوتیدی ژنوم HBV هر بیمار به توالی آمینو اسیدی، حضور جهش های گریز HBsAg (جهش های HBsAg از اسید آمینه 100 تا 147 که توسط نرم افزار geno2pheno از نظر بالینی ارزشمند تلقی می شوند) مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از اتمام پژوهش کلیه اطلاعات توسط نرم افزار SPSS نسخه 15 بررسی گردید. به منظور یافتن ارتباط بین گروه ها از آزمون کای اسکوئر استفاده شد.

HBR-O-F:
5`GGATTGGGGACCTTGCGCTGA3`
HBR-O-R:
5`AGAAGGGTCGTCCGCGGGATT3`
HBR-I-F:
5`TGCTCGTGTACAGGCGGGG3`
HBR-I-R:
5`GGGCAGCAAAACCCAAAAGACC3

برای انجام PCR از تیوب های لیوفلیزه AccuPower® PCR (Bioneer, Korea) با حجم واکنش 50 میکرولیتری استفاده شد. برای انجام مرحله اول PCR 10 میکرولیتر از DNA ویروسی توسط 20 پیکومول از هر کدام از پرایمرهای HBR-O-F و HBR-O-R تکثیر گردید. برای انجام PCR مرحله دوم (Nested-PCR) 5 میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول توسط 20 پیکومول از هر کدام از پرایمرهای HBR-I-F و HBR-I-R تکثیر گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده برای انجام هر دو مرحله PCR در جدول 1 آمده است. در ادامه 10 میکرولیتر محصول مرحله دوم PCR بر روی ژل آگارز 2 درصد الکتروفورز شد (شکل 1).

جدول 1. برنامه حرارتی مورد استفاده به منظور تکثیر قطعه ژن S ویروس هیپاتیت B

مراحل	درجه حرارت (سانتی گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	94	5 دقیقه	1



شکل 1. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز 2 درصد. نمونه های 2، 3، 5، 6 و 10 از نظر HBV-DNA مثبت و قابل تعیین توالی می باشند. M: مارکر 100 جفت بازی، N: کنترل بدون الکو

یافته ها

از 100 بیمار شرکت کننده در مطالعه 36 نفر زن (36 درصد) و 64 نفر (64 درصد) مرد بوده اند. بررسی اطلاعات بیماران در دو گروه صورت گرفت. گروه اول شامل 50 نفر از بیماران هپاتیت B مزمن که هیچ داروی ضد ویروسی استفاده نکرده بوده اند و گروه دوم شامل 50 بیمار هپاتیت B مزمن که حداقل 6 ماه تحت درمان با آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی بوده اند. اطلاعات کلی بیماران در جدول 2 آورده شده است.

جدول 2. توزیع فراوانی اطلاعات کلی بیماران هپاتیت B

اطلاعات بیماران	بیماران درمان نشده	بیماران تحت درمان
مرد (درصد)	33 (66)	31 (62)
میانگین سن	41,72±12,87	42,76±14,93
تعداد بیماران تحت درمان با آدفویر	-	24
تعداد بیماران تحت درمان با ترکیب آدفویر و لامیوودین	-	26

در بین کل بیماران مورد مطالعه 10 جهش گریز HBsAg دیده شده که عبارت بودند از جهش های sA128V, sP127S, sP120S, sG119R, sQ101H, sY134N و sM133I, sT131I, sG130R, sG130N. در گروه بیماران تحت درمان با آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی 16 درصد بیماران واجد ویروس حاوی جهش های گریز HBsAg بودند در حالی که در بیمارانی که تحت درمان دارویی قرار نگرفته بودند 6 درصد بیماران واجد ویروس حاوی جهش های گریز HBsAg بودند. اختلاف مشاهده شده بین فراوانی جهش های گریز HBsAg در دو گروه بیماران از نظر آماری معنی دار نبود (p=0/2, OR=2/98, 95%CI=0/74-11/99). اطلاعات بیماران واجد ویروس حاوی جهش های گریز HBsAg در جدول 3 آورده شده است.

جدول 3. مشخصات بیماران واجد ویروس حاوی جهش های گریز HBsAg

بیماران	جنس/سن (سال)	نوع و مدت مصرف دارو (ماه)	جهش گریز HBsAg
1	مرد/54	آدفویر، 60	sG119R
2	مرد/63	آدفویر، 18	sP120S
3	مرد/71	آدفویر، 24 و لامیوودین، 24	sY134N
4	زن/65	آدفویر، 24 و لامیوودین، 24	sG130R
5	مرد/21	آدفویر، 30 و لامیوودین، 42	sT131I
6	مرد/29	آدفویر، 18 و لامیوودین، 18	sT131I و sG130N
7	مرد/37	آدفویر، 24 و لامیوودین، 24	sQ101H
8	زن/33	آدفویر، 36 و لامیوودین، 36	sP127S و sA128V
9	زن/47	تحت درمان نبوده	sM133I
10	مرد/30	تحت درمان نبوده	sM133I
11	زن/44	تحت درمان نبوده	sM133I

بحث

طی مطالعه ای که در این تحقیق روی 100 بیمار هپاتیت B مزمن صورت گرفت از بین 50 بیماری که هیچ داروی ضد ویروسی استفاده نکرده اند در 6 درصد این بیماران جهش های گریز HBsAg دیده شد و در 50 بیماری که تحت درمان با آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی قرار گرفته اند، 16 درصد بیماران دارای جهش های گریز HBsAg بوده اند. بر این اساس به نظر می رسد که مصرف آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی توسط بیماران مبتلا به هپاتیت B منجر به پیدایش واریته های حاوی جهش های گریز HBsAg نمی شود. الگوی پاسخ به آنالوگ های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی نسبت به داروهای تزریقی (اینترفرون) بسیار سریع تر است و سطح HBV-DNA را سریع کاهش می دهند. اهمیت جهش های گریز HBsAg ناحیه ژنی determinant "a" در تست های آزمایشگاهی که بر اساس اتصال آنتی ژن به آنتی بادی طراحی شده اند مطرح می باشد. وجود این جهش ها مانع اتصال آنتی ژن به

آنتی بادی و یک جواب منفی کاذب را به همراه دارد. در سازمان انتقال خون، با این که خون‌های HBsAg⁺ کنار گذاشته می‌شود اما به نظر می‌رسد در کشور ما و بقیه کشورهای با آلودگی متوسط تا شدید کنار گذاشتن خون‌های HBsAg⁺ برای جلوگیری از انتقال هپاتیت B کافی نیست و غربالگری از نظر هپاتیت B مخفی (Occult hepatitis B) لازم است. هم‌چنین باید توجه کرد که این جهش‌ها می‌توانند با منفی کردن تست HBsAg، برای بیمارانی که دریافت خون به طور مستمر انجام می‌دهند هم‌چون بیماران تالاسمی یک خطر جدی به شمار روند (14). گزارشاتی مبنی بر انتقال هپاتیت B از اهدا کنندگان خون HBsAg⁻ وجود دارد (3). به این واسطه یکی از پیشنهادات مطرح، انجام anti-HBc antibody در سیستم‌های انتقال خون (به خصوص در سیستم‌های انتقال خونی که بررسی مولکولی انجام نمی‌شود) می‌باشد (3). هم‌چنین اهمیت دیگر این جهش‌ها فرار ویروس از واکسن می‌باشد. گزارشی مبنی بر انتقال هپاتیت B به یک دریافت کننده پیوند کلیه واکسینه شده علیه هپاتیت B وجود دارد که ویروس جدا شده از این بیمار حاوی جهش‌های HBsAg در موقعیت‌های 101، 117، 118، 120 و 143 بوده است (15).

سایان و همکاران در مطالعه خود فراوانی جهش‌های HBsAg را در بیماران هپاتیت B مزمن تحت درمان با آنالوگ نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی، 8/3 درصد و در بیمارانی که تحت درمان با داروهای ضدویروسی قرار نگرفته بودند، 8/5 درصد به دست آوردند. نتایج بررسی آماری داده‌ها در این مطالعه به عنوان سطح غیرمعنی‌دار اختلاف تلقی گردید و ثابت کردند که مصرف آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی با جهش HBsAg ارتباط ندارد (16) که با نتایج مطالعه ما هم‌خوانی داشت. بررسی شیوع جهش‌های HBsAg در کشورهای مختلف در بین بیماران هپاتیت B مزمن صورت گرفته است. در مطالعه دیگری که آولون و همکاران در اسپانیا انجام داده‌اند (17)، شیوع جهش‌های HBsAg، 39 درصد گزارش شده است.

فراوانی جهش‌های HBsAg در مطالعه حاضر کمتر از فراوانی جهش‌هایی است که در مطالعه اخیر گزارش شده، که علت اصلی آن گزارش تمام تغییرات اسید آمینه‌ای در محدوده 112 تا 157 پروتئین HBsAg توسط آولون و همکاران می‌باشد، در حالی که در مطالعه ما تنها برخی از تغییرات اسید آمینه‌ای در محدوده 100 تا 147 که تحت عنوان جهش‌های گریز HbsAg شناخته می‌شوند مورد بررسی قرار گرفته‌اند. مطالعه حاضر تأثیر آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی را بر ایجاد جهش‌های گریز HBsAg رد می‌کند ولی جهت تأیید این مطالعه پیشنهاد می‌شود که مطالعه‌ای با تعداد نمونه بیشتر انجام شود. در چنین مطالعه‌ای می‌توان بیماران را بر اساس نوع درمان با آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی دسته‌بندی کرد (درمان با لامیوودین به تنهایی، درمان با آدفویر به تنهایی و درمان هم‌زمان با آدفویر و لامیوودین). هم‌چنین پیشنهاد می‌شود که گروه بیماران تحت درمان به مدت بیش از 1 سال با آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی درمان شده باشند. در نهایت پیشنهاد می‌شود که گروه بیماران تحت درمان از نظر جهش‌های مقاومت دارویی نیز مورد بررسی قرار گیرند و این بیماران از نظر حضور هم‌زمان هر دو دسته جهش (جهش‌های مقاومت دارویی و جهش‌های گریز HBsAg) ارزیابی شوند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که جهش‌های گریز HBsAg در بیماران هپاتیت B الزاماً تحت اثر دارو ایجاد نمی‌شوند و مصرف آنالوگ‌های نوکلئوزیدی/نوکلئوتیدی در ایجاد جهش‌ها گریز HBsAg تأثیر ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از شرکت کاوش فن آور کوثر به دلیل تعیین توالی تقدیر می‌گردد. این مقاله خلاصه‌ای از پایان نامه خانم سپیده مهین روستا جهت دریافت درجه

10. Jongerius J, Wester M, Cuypers H, Oostendorp WR, Lelie P, Poel CL, et al. New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays. *Transfusion*. 1998; 38(1):56-9.
11. Liver EAFTSOT. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2009;50:227-42.
12. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos (t) ide analogues. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1593-608. e2.
13. Altmann A, Bastian B, Hoffmann D, Kaiser R, Lengauer L, Schuldenzucker U, et al. *Geno2pheno*. [updated July 2009]; Available from: <http://hcv.bioinf.mpg.de/index.php>.
14. Chakravarti A, Verma V, Kumaria R, Dubey A. Anti-HCV seropositivity among multiple transfused patients with beta thalassaemia. *Journal of the Indian Medical Association*. 2005;103(2):64-6.
15. Sayiner AA, Agca H, Sengonul A, Celik A, Akarsu M. A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. *Journal of clinical virology*. 2007;38(2):157-60.
16. Sayan M, Şentürk Ö, Akhan SÇ, Hülalü S, Cekmen M. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos (t) ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010;14:e136-e41.
17. Avellón A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus 'a'determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *Journal of medical virology*. 2006;78(1):24-36.

کارشناسی ارشد (به کد تصویب طرح 63415128822678) به راهنمایی دکتر علی پوریاسین و مشاوره دکتر سید مؤید علویان می باشد.

منابع

1. McMahon BJ, editor. *Epidemiology and natural history of hepatitis B*. 2005: New York: Thieme-Stratton, c1981.
2. Lada O, Benhamou Y, Poynard T, Thibault V. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of "a" determinant variants. *Journal of virology*. 2006; 80(6): 2968-75.
3. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *Journal of clinical virology*. 2005;32(2):102-12.
4. Yeh CT. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy. *Antiviral therapy*. 2010;15(3):471-5.
5. Carman WF, Karayiannis P, Waters J, Thomas H, Zanetti A, Manzillo G, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *The lancet*. 1990;336(8711):325-9.
6. Carman W. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *Journal of viral hepatitis*. 1997;4:11-20.
7. Gerlich W, Glebe D, Schüttler C. Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. *Journal of viral hepatitis*. 2007;14:16-21.
8. Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005;23(19):2409-23.
9. Coleman PF, Jack Chen YC. Immunoassay detection of hepatitis B surface antigen mutants. *Journal of medical virology*. 1999;59(1):19-24.