Review Article

Molecular Mechanisms Responsible for Occult Hepatitis B Virus Infection

Vahdat Poortahmasebi [1,2,3], Azam Ghaziasadi [4], Seyed Mohammad Jazayeri [3,4,*]

[1] Infectious and Tropical Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2] Department of Bacteriology and Virology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3] Research Center for Clinical Virology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Hepatitis B Molecular Laboratory, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Occult hepatitis B virus (HBV) infection (OBI); the presence of HBV DNA in the absence of HBsAg, has been recognized as one of the possible phases in the natural history of chronic HBV infection. OBI is a known clinical entity in some clinical settings including blood transfusion, cryptogenic cirrhosis, dialysis patients, solid transplantation, etc. The molecular basis of OBI is closely related to the peculiar life cycle of the HBV, and in particular to the long-lasting persistence of HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) organized as a minichromosome into the nucleus of the infected hepatocytes. This feature together with the long half-life of liver cells imply that HBV infection, once occurred may continue for life, even in condition of strong inhibition of viral transcription and replication. In addition to cccDNA stability, other factors such as immune responses, viral mutations, epigenetic mechanisms, and co-infection are associated with occult infection. Importantly, all the conditions inducing host immunosuppression (i.e., hematological malignancies, chemo-or immunotherapies, etc.) can cause the reactivation of OBI with the development of a typical overt hepatitis B infection.

Keywords: Occult hepatitis B virus infection, Covalently closed circular DNA, Minichromosome

please cite this paper as:
Poortahmasebi V, Ghaziasadi A, Jazayeri SM. Molecular Mechanisms Responsible for Occult Hepatitis B Virus Infection. *Govaresh* 2019;24:68-80.

Corresponding author:
Seyed Mohammad Jazayeri, MD
Hepatitis B Molecular Laboratory, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Telefax: + 98 21 88992660
E-mail: jazayerism@tums.ac.ir

Received: 31 Dec. 2018
Edited: 05 May 2019
Accepted: 06 May 2019

مقاله مروری

مکانیسم های مولکولی عفونت نهفته ویروس هپاتیت B: یک مطالعه مروری

وحدت پورطهماسبی[۱،۲،۳]، اعظم قاضی اسدی[۴]، سید محمد جزایری[۳،۴،*]

[۱] مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲] گروه باکتری شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳] مرکز تحقیقات ویروس شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴] آزمایشگاه مولکولی هپاتیت B، گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

عفونت نهفته ویروس هپاتیت B یکی از فازهای تاریخچه طبیعی عفونت مزمن ویروس شناخته می شود که در آن آنتی ژن سطحی ویروس در سرم حضور ندارد و ژنوم ویروس غیرقابل تشخیص بوده یا حاوی تیتر پایینی می باشد. اساس مولکولی عفونت نهفته هپاتیت B به میزان زیادی با چرخه زندگی ویروس مرتبط بوده و به ویژه پایداری طولانی مدت DNA حلقوی بسته به صورت کوالانت (cccDNA) ویروس ساختمان مینی کروموزم را در داخل سلول های کبدی سازماندهی می کند که عامل مهمی در عفونت نهفته می باشد. پایداری طولانی مدت مولکول های cccDNA همراه با نیمه عمر بالای سلول های کبدی، حتی با وجود مهار رونویسی و همانندسازی ویروس، عامل مهمی در برقراری عفونت می باشد. در حقیقت در عفونت نهفته هپاتیت B، فرآیندهای همانندسازی، رونویسی و سنتز پروتئین قویاً کاهش می یابد. علاوه بر پایداری cccDNA عوامل دیگری همانند پاسخ ایمنی، موتاسیون های ویروسی، فاکتورهای اپی ژنتیک، عفونت همزمان و غیره در بروز عفونت نهفته دخالت دارند. شرایطی در میزبان که باعث سرکوب سیستم ایمنی گردد (مثل بدخیمی های خونی، شیمی درمانی، ایمنوتراپی و غیره) می تواند منجر به فعال شدن مجدد عفونت و مثبت شدن HBsAg گردد.

کلید واژه: عفونت نهفته ویروس هپاتیت B، DNA حلقوی بسته به صورت کوالانت، مینی کروموزوم

گوارش/ دوره ۲۴، شماره ۲/ تابستان ۱۳۹۸/ ۸۰-۶۸

زمینه و مقدمه:

آلودگی به ویروس هپاتیت B[1] (HBV) یکی از چالش های مهم بهداشتی در سراسر دنیا می باشد، به طوری که حدود دو میلیارد نفر در دنیا با این ویروس مواجهه داشته اند و ۲۴۰ میلیون نفر به عفونت مزمن هپاتیت B مبتلا هستند که به عنوان منبع آلودگی برای افراد دیگر محسوب می شوند. شیوع هپاتیت B در مناطق جغرافیایی مختلف از کم (۲٪ >) تا زیاد (۸٪ >) متغیر می باشد.(۱و۲) ورود ویروس به بدن دو پیامد اصلی را به همراه خواهد داشت که یکی عفونت حاد کبدی بوده و بالا رفتن آمینوترانسفرازهای سرمی و بروز زردی از علایم این مرحله می باشد. دیگری مزمن شدن و باقی ماندن در بدن به مدت طولانی می باشد که می تواند علایم بالینی مختلفی از التهاب مزمن با سیر آهسته یا پیشرونده و با نارسایی کبد و یا کارسینوم هپاتوسلولار[2] (HCC) باشد.(۳)

عفونت مزمن هپاتیت B فرآیند دینامیکی است که حاصل برهم کنش همانندسازی ویروس و پاسخ ایمنی میزبان می باشد. تاریخچه طبیعی عفونت مزمن HBV بر اساس حضور آنتی ژن ترشحی ویروس[3] (HBeAg)، تیتر HBV-DNA، میزان آلانین آمینوترانسفراز[4] (ALT) و حضور یا عدم حضور التهاب کبدی به اشکال مختلفی تقسیم می شود.(۴) عفونت نهفته ویروس هپاتیت B[5] (OBI) حالتی از عفونت مزمن است که در آن پایداری و بقاء ژنوم ویروسی در بافت کبدی و در برخی موارد سرم افرادی که آنتی ژن سطحی[6] (HBsAg) آن ها منفی است وجود دارد.(۵) دلایل عدم وجود آنتی ژن سطحی در گردش در بیماران OBI مشخص نیست. اعتقاد بر این است که اساس مولکولی بقاء ویروس HBV در افرادی که آنتی ژن سطحی آن ها منفی است طیفی اعم از عوامل ویروسی و میزبان را شامل شود. این عوامل شامل موارد مختلفی می باشد از جمله: تعداد پایین HBV-DNA، پاسخ ایمنی تغییر یافته میزبان، تغییرات ژنتیکی ژن کدکننده HBsAg، ادغام شدن DNA ویروس در

1. Hepatitis B virus
2. Hepatocellular carcinoma
3. Hepatitis B e antigen
4. Alanine aminotransferase
5. Occult hepatitis B virus (HBV) infection
6. Hepatitis B surface antigen

***نویسنده مسئول:** سید محمد جزایری
آزمایشگاه مولکولی هپاتیت B، گروه ویروس شناسی،
دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تلفن: ۸۸۹۹۲۶۶۰-۰۲۱
نمابر: ۸۸۹۹۲۶۶۰-۰۲۱
پست الکترونیک: jazayerism@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۰
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۸/۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۱۶

ژنوم میزبان، عفونت سلول های تک هسته ای خون محیطی و ایجاد کمپلکس های ایمنی که در آن ها آنتی ژن سطحی مخفی می شود و عفونت همزمان با سایر ویروس ها نظیر ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان[1] (HIV).(۴و۵)

ویروس شناسی هپاتیت B

ویروس هپاتیت B، دارای انولپ (پوشینه) بوده و قطری حدود ۴۲ نانومتر دارد. اجزای اصلی ویریون این ویروس در داخل پوشش کپسید قرار دارند. در میکروسکوپ الکترونی ویروس هپاتیت B دست نخورده به صورت حلقوی و همراه اشکال کروی کوچک تر و توبول های حاوی پروتئین های سطحی دیده می شوند.(۶) در داخل این کپسید، DNA و پروتئین P (پلی مراز) قرار گرفته است و ژنوم آن ها از دو زنجیره DNA ساخته شده است که یکی از آن ها به صورت ناقص است و ۱۵-۵ درصد از ژنوم به صورت تک زنجیره می باشد. این ژنوم دارای یک کونفورماسیون حلقوی است و دارای طولی حدود ۳/۲ کیلوباز می باشد. در انتهای ′۵ هر زنجیره DNA، یک مولکول وجود دارد که به صورت کوالانسی به آن متصل است، به طوری که در انتهای ′۵ زنجیره منفی DNA که دارای طول کامل و واحدی است پروتئین منفرد P متصل است، در حالی که در انتهای ′۵ زنجیره مثبت DNA که دارای طول کمتری از طول واحد است یک ریبوالیگونوکلئوتید Cap دار به آن متصل است. هیچ یک از این دو زنجیره DNA بسته نیستند و حلقوی بودن آن توسط انتهاهای تکرارشونده حفظ می شود. نوکلئوکپسید یا هسته ویریون شامل یک پروتئین اصلی هسته است که آنتی ژن هسته HBV نامیده می شود و با علامت اختصاری HBcAg نشان داده می شود.(۷-۹)

ژنوم HBV حاوی چهار قالب خواندن باز[2] (ORF) به نام های زیر می باشند:

۱- ORF-P که پروتئین پلی مراز ویروس را کد می کند،
۲- ORF-S که پروتئین های انولپ ویروس را کد می کند.
۳- ORF-C که پروتئین های کپسید و پروتئین ترشحی ویروس را کد می کند.
۴- ORF-X که پروتئین ترانس اکتیواتور HBX را کد می کند.

کپسید دارای تقارن ۲۰ وجهی بوده و حفراتی در آن وجود دارد. همچنین دارای خارهایی[3] است که به صورت برآمده از سطح کپسید مشخص اند. پوشش لیپیدی (انولپ) ویروسی دارای ۳ نوع پروتئین به نام های S (Small)، M (Medium) و L (Large) می باشد. پروتئین های M و L از پروتئین S بزرگ ترند ولی پروتئین S فراوان تر از دو پروتئین L و M وجود دارد (با نسبت ۱:۱:۴). نواحی سطحی پروتئین های پوشش، آنتی ژنی را تشکیل می دهند که به عنوان آنتی ژن سطحی هپاتیت B یا HBsAg مطرح است.(۶) HBV انسانی دارای ۱۰ ژنوتیپ می باشد که به صورت A-J نمایش می دهند. ژنوتیپ ها در ۱۷-۸ درصد در سطح نوکلئوتیدها با هم تفاوت دارند و شیوع هر کدام از آن ها در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت است.(۱۰و۱۱)

گیرندهٔ ویروس هپاتیت B، احتمالاً گیرنده های ترانسفرین، گیرنده آسیالوگلیکوپروتئین[4]، آنکسین V[5] و IgA پلیمریک بوده و ویروس از طریق پروتئین Pre S1 (LHBs) به عنوان لیگاند به این گیرنده ها متصل می شود. اخیراً مشخص شده است که پپتید هم انتقالی توروکولات سدیم[6] (NTCP) به احتمال زیاد به عنوان گیرنده HBV به کار می رود.(۸و۱۲) مکانیسم ورود به داخل سلول از طریق اندوسیتوز با واسطه گیرنده بوده و سپس با ادغام غشای ویریون و اندوزوم، نوکلئوکپسید به درون آزاد می شود. نوکلئوکپسید پس از ورود به داخل هپاتوسیت ها، بدون تغییر به درون هسته هدایت می شود و در آن جا DNA حلقوی آزاد شده و به صورت کووالانسی تبدیل به DNA حلقوی بسته[7] (cccDNA) می شود. این نوع DNA یک واسطه مهم در همانندسازی بوده و به عنوان الگویی برای رونویسی عمل می کند. رونویسی توسط آنزیم RNA پلی مراز II و از روی رشته منفی انجام می شود و ۵ گروه از mRNA های پیرایش نشده[8] تولید می کند. یکی از این RNA ها که موسوم به RNA پری ژنومیک[9] (pgRNA) بوده و بزرگتر از ژنوم می باشد (۳/۵ کیلوباز)، علاوه بر این که پروتئین های Core و پلی مراز را کد می کند، همچنین به عنوان الگویی برای سنتز ژنوم عمل کرده و توسط آنزیم RT (پلی مراز) از روی آن DNA رشته منفی سنتز می گردد. هیبرید DNA-RNA توسط فعالیت RNase H آنزیم پلی مراز از هم دیگر باز شده و سپس رشتهٔ مثبت DNA از روی رشته منفی ساخته می شود.(۱۱و۱۳و۱۴) در ناحیه ′3 pgRNA ساختمانی به نام اپسیلون (ε) وجود دارد که در بسته بندی pgRNA توسط پروتئین Core و همچنین اتصال آنزیم پلی مراز به آن نقش دارد. گردهمایی ویریون HBV نیازمند پروتئین های LHBs و MHBs می باشد. ویریون ها همراه با ذرات SHBs (HBsAg) از شبکه آندوپلاسمی و گلژی عبور کرده و طی تغییراتی که در این مکان ها متحمل می گردند از طریق اگزوسیتوز به خارج سلول ترشح می شوند.(۱۱)

عفونت نهفته ویروس هپاتیت B

عفونت نهفته هپاتیت B نوعی از عفونت مزمن هپاتیت مزمن B می باشد که به صورت عدم حضور ژنوم ویروس یا سطح پایین HBV-DNA سرمی (<۲۰۰۰ IU/mL) و حضور سلول های ایمنی و غیاب HBsAg تعریف می شود. در این بیماران سطح ALT نرمال می باشد. بیش از ۲۰٪ این بیماران هیچ گونه مارکر سرولوژیک HBV را ندارند و تیتر آنتی بادی ممکن است به مدت طولانی غیرقابل مشاهده بوده و اجازه می دهد تا HBV-DNA تنها مارکر عفونت باشد. OBI بر اساس آنتی بادی های علیه HBV (anti-HBc ویا anti-HBs) می تواند از نظر سرولوژی مثبت[10] یا منفی[11] باشد. بیماران مبتلا به عفونت نهفته هپاتیت B اغلب به صورت anti-HBc مثبت و anti-HBs منفی هستند. OBI را باید از موتانت های S افتراق داد که در آن HBsAg علی رغم حضور cccDNA داخل کبدی غیرقابل مشاهده است.(۱۵) این موارد که اصطلاحاً OBI کاذب[12] خوانده می شوند به دلیل سویه هایی از HBV هستند که به علت جهش در ناحیه

1. Human Immunodeficiency Virus
2. Open reading frame
3. Spike

4. Asialoglycoprotein
5. Annexin V
6. Sodium taurocholate cotransporting peptide
7. Covalently closed circular DNA
8. Non-spliced
9. Pregenomic RNA
10. Seropositive OBI
11. Seronegative OBI
12. False occult HBV

pre-S توسط کیت های تجاری شناسایی نمی شود. OBI کاذب در ۴۰٪ بیماران گزارش شده است. در تشخیص HBsAg با استفاده از آنتی بادی های anti-HBs چند ظرفیتی[1] می توان موارد کاذب OBI را مشخص کرد. (۱۶و۱۷) اگر HBsAg قبل از بروز سیروز حذف شود خطر ابتلا به سیروز، جبران کبدی و HCC به طور قابل توجهی کاهش می یابد. به هر حال اگر بیماری قبل از پاک شدن HBsAg به سمت سیروز پیشرفت کند، خطر ابتلا به HCC افزایش می یابد. OBI از نظر بالینی اهمیت فراوانی دارد. هوفانگل[2] و همکاران ابتلا به OBI را در دریافت کننده خون از دهنده anti-HBC گزارش کرد.(۱۸) این یافته نشان می دهد که این افراد می توانند به عنوان مخزنی از عفونت HBV عمل کنند. عفونت نهفته HBV همچنین از این جهت که سرکوب ایمنی باعث فعال شدن مجدد ویروس می گردد حائز اهمیت می باشد.(۴)

عفونت OBI از لحاظ بالینی دارای اهمیت است: فعال شدن مجدد عفونت و متعاقب آن پیشرفت بیماری کبدی، انتقال ویروس نهفته به طور عمده از طریق انتقال خون در پیوند ارتوتوپیک کبد[3] (OLT) که منجر به ابتلا فرد گیرنده به HBV می شود، تأثیر روی پیشرفت بیماری کبدی مزمن و سرطان کبد.(۱۶)

شیوع بالینی OBI

شیوع عفونت نهفته هپاتیت B ارتباط زیادی با شیوع کلی HBV در جمعیت عمومی مناطق جغرافیایی مختلف دارد. تنوع شیوع و فراوانی HBV در بین جوامع مختلف متنوع بوده و به عوامل مختلفی از جمله حجم نمونه مورد بررسی، حساسیت تکنیک های سرولوژی و مولکولی مورد استفاده، روش های استخراج DNA، عفونت همزمان با سایر میکروب ها و نوع نمونه بالینی (سرم، بافت کبد، سلول های تک هسته ای خون محیطی) بستگی دارد.(۱۹)

شیوع OBI در دنیا متغیر بوده و میزان گزارش ها در آسیا به علت فراوانی بالای HBV نسبت به سایر مناطق دنیا بیشتر است. علی رغم شیوع منطقه ای بالای HBV، شیوع هپاتیت B نهفته در بین جمعیت با خطر پایین نظیر دهندگان خون، که در گروه های مختلفی از آسیا و آفریقا پایین است کمتر گزارش شده است. میزان شیوع عفونت نهفته HBV کمتر از ۱٪ در جمعیت عمومی[4] تا بیشتر از ۸۷٪ در گروه های مختلف بیماران از نواحی مختلف جهان گزارش شده است.(۵) مطالعات مختلف نشان داده اند که شیوع OBI در مناطقی که HBV اندمیک است به طور قابل توجهی بیشتر از مناطقی می باشد که شیوع HBV پایین است. بر این اساس واریانس شیوع OBI قویاً به محل اندمیک عفونت HBV مرتبط می باشد.(۲۰و۲۱) مطالعات اندکی در زمینه شیوع OBI در جمعیت عمومی انجام شده است. در یک مطالعه که روی ۱۰۹۱ نفر انجام شد مارکرهای مختلف ویروسی مورد بررسی قرار گرفتند و نتیجه نشان داد که تنها ۷ نفر (۰/۶ درصد) حاوی HBV-DNA در غیاب HBsAg هستند. مطالعات دیگری که در کشور آلمان (روی ۵۳۰۵ نفر) و کره جنوبی (۱۴۲۵۳ نفر) روی جمعیت عمومی انجام شده است، شیوع OBI به ترتیب ۰/۱ و ۰/۲ به دست آمده است.(۲۲) مطالعات مختلف نشان داده اند که شیوع OBI در گروه های مختلف افراد و بیماران متفاوت می باشد.(۲۳و۲۴) میزان شیوع

1. Multivalent anti-HBs antibodies
2. Hoofnagle
3. Orthotopic liver transplantation
4. General population

جدول ۱: گروه های با خطر ابتلا به عفونت نهفته HBV (بر گرفته و ویرایش شده از Samal و همکاران) (۵)

گروه بیماران	شیوع گزارش شده (٪)
عفونت مزمن هپاتیت C	۱۵-۳۳
عفونت HIV	۰-۸۹
معتادان تزریقی	۴۵
همودیالیز	۰-۵۸
کارسینومای هپاتوسلولار	۶۲
سیروز کبدی کریپتوژنیک	۳۲
پیوند کبد	۶۴

این فاز از عفونت مزمن هپاتیت B در بیماران مبتلا به سیروز ناشی از ویروس هپاتیت C ۳۳٪ و در بیماران غیر HCV ۱۹٪ گزارش شده است. عفونت نهفته هپاتیت B همچنین با افزایش آنزیم های کبدی در طی عفونت مزمن هپاتیت C مرتبط می باشد.(۲۵و۲۶) OBI در ۷۳٪ بیماران HCC ناشی از ویروس هپاتیت C گزارش شده است.(۲۷و۲۸) شیوع OBI در بیماران همودیالیزی در جوامع مختلف متفاوت بوده و بین ۰ تا ۵۸ درصد متغیر است. شیوع OBI در این بیماران در آمریکای شمالی ۳/۷٪ و در هند ۴/۹٪ گزارش شده است.(۲۹و۳۰) در یک مطالعه چند مرکزی در ایران فراوانی HBV-DNA در بیماران همودیالیزی که فاقد HBsAg بوده و از نظر Anti-HBc مثبت بودند ۵۰٪ گزارش شده است (۹ نفر از ۱۸ نفر).(۳۱) در یک مطالعه دیگری که توسط نگارندگان این مقاله انجام شده است، شیوع OBI در کودکانی که از مادران HBsAg مثبت به دنیا آمده و واکسن و ایمونوگلوبولین دریافت کرده اند ۲۸٪ گزارش شده است (۲۱ کودک از ۷۵ کودک).(۳۲) همچنین فراوانی OBI در بیماران ایرانی مبتلا به HIV-1 ۱۸٪ به دست آمده است (۳۱ نفر از ۱۷۲ نفر).(۳۳) شیوع OBI در گروه های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است.(۵)

مکانیسم های مولکولی عفونت نهفته هپاتیت B

عفونت نهفته OBI یک پدیده ایست که اساساً به پایداری داخل کبدی ویروس و سرکوب شدید تکثیر و بیان ژن ویروسی نسبت داده می شود. DNA ویروس در سرم در سطح پایین بوده و برای تشخیص آن نیاز به تکنیک های بیولوژی مولکولی حساس و اختصاصی دارد.(۳۴) اساس مولکولی عفونت مخفی مربوط به ویژگی چرخه زندگی ویروس است که چندین فرضیه برای آن مطرح شده است: ۱) تغییر پاسخ ایمنی میزبان، ۲) موتاسیون در توالی ژنوم HBV، ۳) تداخل HBV با دیگر ویروس ها از جمله HIV، ۴) ادغام شدن HBV-DNA در کروموزم میزبان، ۵) پایین بودن سطح سرمی HBsAg.(۳۵)

فاکتورهای ایمونولوژیکی

پاسخ ایمنی میزبان نقش مهمی در حذف، پایداری و ایمونوپاتوژنز ویروس دارد. چندین پاسخ سیستم ایمنی نظیر مرگ برنامه ریزی شده سلولی، پاسخ سلول های سیتولیتیک و غیرسیتولیتیک و پلی مورفیسم گیرنده ویتامین D در تنظیم چرخه زندگی HBV و تولید پروتئین های

ویروس نقش مهمی دارند.(۳۶) از دهه ۱۹۷۰، مطالعات بالینی مختلف شواهد محکمی را فراهم نمود که مشخص می کند شرایطی که در بیمار منجر به سرکوب ایمنی گردد با خطر فعال شدن عفونت OBI و پدیدار شدن پروفایل سرولوژیکی عفونت آشکار و فعال شدن مجدد هپاتیت B همراه است.(۳۷-۳۹) شواهدی مبتنی بر نقش اصلی سیستم ایمنی میزبان در بروز OBI وجود دارد. اهمیت دخالت سیستم ایمنی در عفونت OBI با اطلاعاتی که از پاسخ های خاطره ای سلول های T اختصاصی هپاتیت B به دست آمده، مشخص کرده است که DNA ویروسی سال ها پس از بهبودی از عفونت حاد ویروسی هپاتیت B همچنان وجود دارد.(۴۰و۴۱) مطالعات قویاً نشان می دهد که بهبود بالینی ضرورتاً به معنای حذف کامل هپاتیت B نبوده و کارآیی سیستم ایمنی را مشخص می کند که حداقل تیتر ویروس پس از بهبود بالینی همچنان حفظ می گردد. این فرضیه با این یافته ها تأیید گردید که همراه با حضور مولکول cccDNA، تمامی رونوشت های ویروس هپاتیت B (شامل pgRNA) می تواند در کبد افراد OBI وجود داشته و قابل اندازه گیری می باشد.(۴۲و۴۳) مطالعات مختلف شواهدی نشان داده است که پاسخ سلول های T با اختصاصیت قوی نسبت به عفونت هپاتیت B در افراد مبتلا به عفونت OBI وجود دارد.(۴۴و۴۵) به ویژه مشخص شده است که بیماران OBI با/یا بدون anti-HBc، پروفایل متفاوتی از پاسخ سلول های T اختصاصی در مقابل هپاتیت B را نشان می دهند. علی رغم حضور سلول های T اختصاصی هپاتیت B در گردش در بیماران OBI Seropositive (anti-HBc مثبت)، این سلول ها فراوانی قابل مقایسه ای در مقایسه با بیماران OBI Seropositive (anti-HBc منفی) دارند. تولید اینترفرون گاما در شرایط in vitro توسط سلول های T اختصاصی هپاتیت B در بیماران OBI Seropositive ضعیف است.(۴۴) از سوی دیگر بر اساس شواهدی که از مدل های حیوانی موش خرما به دست آمده مشخص شده است که عملکردهای مجزایی در پاسخ های ایمنی سلولی در افراد OBI seropositive & seronegative وجود دارد و مدل های مختلف انتقال هپاتیت B را دارا می باشند. در حقیقت موش خرماهایی که با دوز پایین ویروس هپاتیت موش خرما[1] (WHB) (کمتر از ۱۰۳ ویریون) مواجه شده اند احتمال بروز عفونت پایدار علی رغم حضور مارکرهای سرمی زیاد است. به طور جالب توجهی موش خرماهای اولیه ای که عفونت OBI داشتند ایمنی محافظت کننده ای نداشته و این ثابت می کرد که عفونت تنها با تزریق دوزهای بالاتر می تواند پاسخ های سلول های T خاطره ای کارا ایجاد کند. پاسخ سلول های T اختصاصی هپاتیت B در بیماران مبتلا به OBI نسبت به ناقلین غیرفعال و افرادی که بهبودی قبلی هپاتیت B داشتند قوی تر است.(۴۶) این یافته ها نشان می دهد که دلیل تیتر بسیار پایین HBV-DNA و همچنین عدم حضور HBsAg سرمی در بیماران OBI، پایداری ایمنی میزبان در توانایی کنترل هپاتیت B می باشد.(۴۷)

احتمال آن وجود دارد که در عفونت OBI، مقادیر اندکی از ویروس توسط سلول های T خاطره ای مرکزی به سلول های افکتور تمایز یافته و عملکرد ویروس را محدود نمایند. علاوه براین مطالعات نشان داده است که پاسخ ایمنی ذاتی نیز ممکن است نقش مهمی در کنترل چرخه زندگی هپاتیت B داشته باشد. مطالعات در موش ترانس ژنیک و شامپانزه ها نشان داده که سایتوکاین های التهابی نظیر اینترفرون تیپ I (INF-I) و TNF-α می تواند به طور مؤثری تکثیر ویروس را از طریق مکانیسم های دفاعی غیرسیتوپاتیک سیستم ایمنی ذاتی مهار کند.(۴۸) سلول های کبدی پاسخ های ایمنی ذاتی را در مقابل عفونت هپاتیت B افزایش داده و با تولید ژن های تحریک کننده INF، تکثیر هپاتیت B را از طریق مهار سنتز رونوشت های cccDNA و کپسیددار شدن pgRNA محدود می کند.(۴۹) علاوه بر این، فعال شدن رسپتورهای شبه RIG در هپاتوسیت هایی که اینترفرون گاما و سایتوکاین های پیش التهابی را القاء می کنند و همچنین فعال شدن مسیرهای ضد ویروسی داخل سلولی توسط NF-κβ و IRF3، پروتئین های ضدویروسی را القاء کرده و از طریق مداخله در چرخه زندگی ویروس مانع تکثیر هپاتیت B می گردد.(۵۰) گیرنده های شبه Toll[2] (TLRs) یکی از بازوهای اصلی پاسخ ایمنی ذاتی می باشد. مطالعات ویلیام[3] و همکاران بر روی WHB و نمونه های بافت کبد و سلول های تک هسته ای خون محیطی نشان داد که پروفایل بیان ژنی TLR ها می تواند در بروز مراحل مختلف عفونت مزمن هپاتیت B و همچنین OBI نقش داشته باشد.(۵۱) این یافته نشان می دهد که پاسخ ایمنی ذاتی می تواند در تنظیم مراحل مختلف عفونت مزمن و کنترل ویروس های اعضای خانواده هپادناویروس ها نقش داشته و از این رو پاسخ ایمنی ذاتی می تواند اهداف دارویی مناسبی برای مقابله با HBV باشند.

علاوه بر پاسخ سیستم ایمنی، فاکتورهای ژنتیکی میزبان نیز در بروز OBI تأثیرگذار است. مطالعات نشان داده اند که آنتی ژن لکوسیتی انسان[4] (HLA) که نقش مهمی در پاسخ ایمنی ایفاء می کند، در پیشرفت بیماری مزمن HBV اهمیت دارد. برخی از پلی مورفیسم های HLA در تعیین پیشرفت بیماری و همچنین پیامد بیماری مزمن (پایداری یا حذف شدن) اهمیت دارند.(۵۲) در زمینه پاسخ سایتوکاینی نیز مشخص شده است که سطح سرمی اینترلوکین ۱۰ در بیماران مبتلا به OBI به طور قابل توجهی بیشتر از گروه کنترل است. همچنین پلی مورفیسم در پروموتر اینترلوکین ۱۰ بیماران مبتلا به OBI به طور قابل توجهی مشاهده شده است که دلالت بر ارتباط این سایتوکاین و OBI دارد.(۵۳و۵۴)

موتاسیون های HBV

تغییرات محیطی القا شده توسط سیستم ایمنی، واکسن، ایمونوگلوبولین هپاتیت B[5] (HBIG)، یا داروهای ضدویروسی می توانند باعث بروز موتاسیون هایی شوند که منجر به فرار ویروس از موانع حفاظتی ایمنی و همچنین تست های تشخیصی گردد، که مهم ترین آن ها بروز موتاسیون هایی می باشد که باعث تغییر کونفورماسیون در ناحیه آنتی ژنیک "a" determinant می گردد.(۵۵و۵۶) مطالعات مختلفی نشان داده اند که کونفورماسیون سه بعدی پروتئین نقش مهمی در عملکرد بیولوژیکی آن و همچنین برهم کنش با سایر مولکول ها دارد.(۵۷) پروتئین HBsAg حاوی ۲۲۶ آمینواسید است که نواحی مختلف آن برای انواع مختلفی از سلول های ایمنی به عنوان آنتی ژن غالب عمل می کند. ناحیه آمینواسیدهای ۱۶۰-۱۰۰، نواحی مهم برای پاسخ به لنفوسیت های B بوده و به منطقه اصلی هیدروفیلیک[6] (MHR) موسوم است. ناحیه "a" determinant پروتئین HBsAg یک ناحیه مستعد موتاسیون های متعدد بوده که در منطقه MHR و فاصله ۱۴۷-۱۲۴ قرار دارد و بروز

1. Woodchuck hepatitis virus

2. Toll-like receptors
3. Williams
4. human leukocyte antigen
5. Hepatitis B immunoglobulin
6. Major hydrophilic region

انواع موتاسیون در این ناحیه پیامدهای متفاوتی را در پی خواهد داشت. در ناحیه "a" determinant دو لوپ آنتی ژنیک وجود دارد که توسط پیوندهای دی سولفیدی بین آمینواسید سیستئین در جایگاه ۱۳۹ و ۱۴۷ و لوپ دیگر بین آمینواسید سیستئین که بسیار حفاظت شده می باشد و در جایگاه ۱۲۴ و ۱۳۷ قرار دارد. علاوه بر این دو لوپ اصلی، در برخی موارد یک لوپ کوچک می تواند بین سیستئین های ۱۲۱ و ۱۲۴ وجود داشته باشد.(۵۸) ناحیه "a" determinant حاوی آمینواسیدهای مهمی است که اجازه می دهد تا لوپ های موجود در آن با انعطاف پذیری بالا با محیط اطراف خود برهم کنش انجام دهد. بنابراین موتاسیون هایی که باعث تغییر این انعطاف پذیری گردد منجر به تغییر آنتی زنیسیته شده و در نتیجه توانایی قبلی همانند سویه رفرانس را نخواهد داشت.

وینبرگر[1] و همکاران مشخص کردند که موتاسیون در ناحیه MHR ژن S در عفونت نهفته HBV نقش دارد.(۵۹) چندین موتاسیون شناسایی شده اند که بیان، ترشح یا حذف HBsAg را تحت تأثیر قرار دهند که مبنایی برای بروز OBI می باشد. موتاسیون Y100C در مطالعات مختلف با فنوتیپ HBsAg منفی مرتبط می باشد.(۶۰) همچنین موتاسیون های مختلفی نظیر Y134H، P120A و S143T ممکن است در کاهش میزان HBsAg سرمی نقش داشته باشند.(۶۱) مطالعات مختلف در شرایط in vitro نیز نشان داده اند که برخی از جهش ها با کاهش سنتز HBsAg در ارتباط هستند. جهش تبدیل گلیسین به آرژنین در موقعیت ۱۴۵ (G145R) با کاهش شدید تولید HBsAg در شرایط in vitro مرتبط می باشد. جهش های دیگری در موقعیت ۱۴۵ پروتئین HBsAg گزارش شده اند، گرچه جزو جهش های با فراوانی بالا در بیماران مبتلا به OBI نیستند. مشخص شده است که جهش G145R به عنوان موتانت فرار از ایمنی[2] عمل کرده و همچنین نقش مهمی در مقاومت به داروی ضد ویروسی لامیوودین ایفاء می نماید. با این توصیف جهش G145R می تواند به عنوان موتانت فرار از واکسن[3] در نظر گرفته شود.(۶۲) همچنین نشان داده شده است که جهش G145R منجر به کاهش ترشح HBsAg و افزایش همانندسازی در موتانت های مقاوم به داروی لامیوودین می گردد.(۶۳)

علاوه بر موتاسیون های پروتئین HBsAg، برخی موتاسیون های حذفی در ناحیه Pre-S می توانند با فقدان حضور HBsAg در سرم بیماران مبتلا به OBI در ارتباط باشند. جهش حذفی در ناحیه Pre-S باعث کاهش بیان پروتئین های سطحی شده و به پایداری ویروس در مقابل سلول های ایمنی کمک می کند.(۶۴) موتاسیون های Pre-S1/ Pre-S2 با شیوع زیادی در بیماران مبتلا به OBI مشاهده شده است. در مطالعه ای یک حذف ۱۸۳ نوکلئوتیدی ناحیه Pre-S1 در بیماران مبتلا به OBI مشاهده گردید که این موتاسیون حذفی نواحی را پوشش می دهد که محل اتصال فاکتورهای رونویسی می باشد. موتاسیون های نقطه ای متعددی نیز در ژن Pre-S مشاهده شده اند. ارتباط موتاسیون های نقطه ای و حذفی نواحی Pre-S با از دست دادن قدرت ترشح HBsAg، سطح پایین HBeAg و HBV-DNA همراه است که از طریق ترانسفکشن به رده های مختلف کشت سلولی سلول های کبدی مشخص شده است.(۶۵) برخی مطالعات ثابت کرده اند که کاهش HBsAg در رده کشت های سلولی با از دست دادن قدرت اتصال فاکتور رونویسی SP1 (Specificity protein 1) مرتبط است.(۶۵و۶۶) چنین موتاسیون هایی بیماران مبتلا به هپاتیت B را مستعد ابتلا به کارسینوم هپاتوسلولار می کند که با فعال شدن مسیر ER-stress ناشی از این موتاسیون ها بروز آن افزایش می یابد.(۶۷)

1. Weinberger
2. Immune escape mutant
3. Vaccine escape mutant

آنزیم پلی پپتید کاتالیتکی ویرایش کننده mRNA آپولیپوپروتئین B و عفونت OBI

آنزیم پلی پپتید کاتالیتکی ویرایش کننده mRNA آپولیپوپروتئین B[4] (APOBEC3) فعالیت سیتیدین دآمیناز دارد و نقش کلیدی در تنظیم راهبردهای ایمنی ذاتی در مقابل رتروویروس ها و همچنین پارارتروویروس هپاتیت B دارد.(۶۸) این آنزیم باعث موتاسیون G→A در هر دو رشته مثبت و منفی ویروس هپاتیت B می شود. بیان APOBEC3G در سلول های تکثیر کننده هپاتیت B باعث کاهش حدود ۵۰ برابری HBV-DNA در محیط های کشت سلولی می شود که این عملکرد مهاری وابسته به دوز بوده و سطح DNA ویروسی متصل به Core را داخل هپاتوسیت ها کاهش می دهد.(۶۹) مکانیسم های وابسته به عملکرد دآمیناسیون و همچنین مکانیسم های غیر وابسته به دآمیناسیون در مهار تکثیر هپاتیت B توسط APOBEC نقش دارند.(۶۸) اخیراً مشخص شده است که پاسخ ایمنی ذاتی مرتبط با INF-α می تواند بیان APOBEC3A را در سلول های آلوده به هپاتیت B افزایش داده و پروتئین APOBEC3A از طریق مداخله در برهم کنش بین پروتئین Core و cccDNA باعث دآمیناسیون باز سیتیدین، تشکیل جایگاه آپورین/آپیریمیدین و در نهایت تجزیه cccDNA و ممانعت از تکثیر هپاتیت B می گردد.(۷۰) مشخص شده است که بیش از ۳۵٪ ژنوم HBV می توانند در داخل سلول های کبدی توسط آنزیم های APOBEC که دآمیناز غالب در محیط in vivo می باشد ویرایش شوند. همان طور که پیشتر ذکر گردید یکی از موتاسیون های شایع در بیماران مبتلا به OBI در آمینواسید موقعیت ۱۴۵ پروتئین HBsAg است که باعث تبدیل آمینواسید گلیسین به آرژنین می شود (G145R). همچنین موتاسیون شایع دیگر که در موقعیت ۱۸۹۶ ژنوم رخ می دهد باعث ایجاد کدوم خاتمه در آمینواسید شماره ۲۸ می شود (W28Stop). در حالت عادی این موقعیت آمینواسید تریپتوفان (W) را کد می کند و در صورت بروز موتاسیون کدون خاتمه ایجاد شده و در نهایت منجر به عدم سنتز HBeAg می گردد. هر دو موتاسیون های یاد شده از نوع G→A بوده و اعتقاد بر این است که آنزیم های خانواده APOBEC در این فرآیند نقش دارد.(۷۱) در نتیجه آنزیم های APOBEC می توانند با تأثیر بر روی ژن های کد کننده HBsAg و Pre-Core در بروز OBI نقش بسزایی داشته باشند. توالی ویرایش شده ژنوم HBV در بیماران مبتلا به OBI مشاهده شده است.(۷۱و۷۲) با این وجود عفونت نهفته مرتبط با آنزیم APOBEC می تواند در غیاب ویرایش قابل توجه HBV DNA نیز رخ دهد که احتمالاً از طریق مکانیسم های غیر وابسته به دآمیناسیون ایجاد می شود.(۷۲)

فاکتورهای اپی ژنتیک

اغلب ویروس ها ژنوم خود را داخل ذرات نوکلئوپروتئین محافظت کننده بسته بندی می کنند تا بتوانند به ماشین کروماتین سلول میزبان دسترسی پیدا کنند و از این رو منجر به بهبود چرخه تکثیر ویروسی

4. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptides

شده و یا باعث حفظ حالت نهفته و پایداری آن ها می شود.(۷۳) در سال های اخیر بررسی ها بر روی تغییرات دینامیکی کروماتین ویروسی مشخص کرد که دینامیک برهم کنش کروماتین ویروس- سلول میزبان حائز اهمیت بوده و فرآیندهای ضروری ویروسی شامل بیان ژن و تکثیر را تنظیم می کند.(۷۴) چندین عامل مختلف در الگوی اپی ژنتیک ساختار کروموزوم ویروسی دخالت دارد که اغلب با تغییرات پروتئین های هیستونی و متیلاسیون DNA مرتبط هستند. در مورد ویروس های حاوی ژنوم DNA بزرگ نظیر هرپس ویروس مرتبط با سارکوم کاپوسی[1] (KSHV) و ویروس اپشتین- بار[2] (EBV) که دارای مرحله نهفتگی هستند، ارتباط نوآرایی کروماتین با حالت نهفته ویروس ثابت شده است. در طول مرحله نهفتگی، ژنوم ویروس های مذکور به عنوان مینی کروموزوم چند نسخه ای حفظ شده تبدیل شده و ساختار کروماتین به خود می گیرد که مشابه کروموزوم سلول میزبان است. اطلاعات موجود نشان می دهد که هر دو ویروس حاوی فاکتورهای متصل شونده به کروماتین و تغییرات اپی ژنتیک دنباله های هیستونی هستند که می توانند به عنوان مکانیسم هایی برای حفظ بیان ژن در طی عفونت مخفی عمل کنند.(۷۳و۷۵)

مطالعات اخیر نشان داده است که مکانیسم های اپی ژنتیک نقش مهمی در تنظیم رونویسی و تکثیر هپاتیت B ایفا می کند.(۷۶) مولکول های cccDNA که در هسته هپاتوسیت های عفونی وجود دارند به عنوان مینی کروموزوم های مستقل پایدار بوده و ساختار تسبیح مانندی را توسط میکروسکوپ الکترونی نمایش می دهند. این ساختارها باعث بسته بندی DNA ویروس به داخل نوکلئوزومی نیمه کامل یا کامل شده و نشان دهنده تغییرات دینامیکی است که منجر به فعالیت رونویسی می شود.(۷۷و۷۸) مینی کروموزوم cccDNA پروتئین های هیستون و هم غیر هیستونی را شامل می شود.(۷۶) ایمنوبلاتینگ بر روی کمپلکس های نوکلئوکپسید هسته ای خالص شده نشان داده است که پروتئین های هیستونی H3، H2B، H2A، H1 و H4 و همچنین پروتئین Core ویروس به عنوان عناصر ساختاری مینی کروموزوم هپاتیت B شرکت می کنند(۷۹) اطلاعات به دست آمده از سلول های هپاتوما و نمونه های بافت کبد نشان می دهد که تکثیر هپاتیت B توسط تغییرات استیلاسیون هیستون های H3/H4 متصل به cccDNA ویروسی تنظیم می شود و فعالیت هیستون داستیلاز[3] (HDACs) با کاهش تکثیر هپاتیت B در شرایط in vitro همراه بوده و همچنین منجر به ویرمی پایین در شرایط in vivo می گردد. سلول های آلوده به ویروس هپاتیت B با مهارکننده های HDAC تیپ I و II (نظیر تری کواستاتین، والپروات و نیکوتین آمید) باعث افزایش چشم گیر استیلاسیون هیستون های متصل شونده به cccDNA می گردد.(۸۰)

در بیماران مبتلا به OBI هیستون های متصل شونده به cccDNA به میزان زیادی هیپو استیله هستند و چندین فاکتور خاموش کننده کروماتین همانند HDAC1، پروتئین هتروکروماتین HD1 و متیلاز H3K9، SUV39H1 در داخل مینی کروموزوم ویروسی حضور دارند. ممکن است مهار تکثیر و رونویسی ویروس در کبد بیماران مبتلا به OBI توسط تغییرات اپی ژنتیک cccDNA و هیستون های متصل به cccDNA صورت گیرد. به طور جالب توجهی شواهد اخیر نشان داده است که INF-α در کشت های سلولی و موش های کایمریک قادر است رونویسی RNA ویروسی از روی cccDNA را مهار کند. در پاسخ به INF-α هیستون های متصل شونده به DNA هیپو استیله شده و فاکتورهای مهار کننده رونویسی شامل کمپلکس PRC2 به طور فعالی رونویسی از cccDNA را مهار می کنند.(۸۱و۸۲) علاوه بر پروتئین های هیستونی، پروتئین ویروسی HBx نیز در ساختار مینی کروموزوم cccDNA حضور دارد، به طوری که موتانت های HBx در تکثیر ویروس نقص دارند.(۸۳)

علاوه بر دینامیک کروماتین، متیلاسیون جایگاه اختصاصی CpG ژنوم هپاتیت B در تنظیم بیان ژن و تکثیر ویروس مشارکت دارد.(۳۷و۷۶و۸۴) ژنوم هپاتیت B شامل سه ناحیه غنی از CpG است (جزایر CpG تکراری) که در اطراف جایگاه شروع ATG ژن S و enhancer I (جزیره I)، پروموتر ژن X (جزیره II) و جایگاه شروع ATG ژن پلی مراز (جزیره III) قرار دارند. به طور جالب توجهی جزایر CpG I, III در بیماران مبتلا به HCC و رده سلول های هپاتوما هایپرمتیله هستند.(۷۲و۸۴و۸۵) آنالیز متیلاسیون DNA در گروهی از بیماران OBI نشان داد که جایگاه های اختصاصی CpG در ژنوم هپاتیت B معمولاً هیپرمتیله می باشند.(۷۲) با این وجود مکانیسم دقیق تأثیر متیلاسیون جزایر CpG روی عملکرد ژنوم هپاتیت B و عفونت نهفته آن مشخص نیست و نیازمند بررسی های بیشتر است.

میکرو RNA و عفونت نهفته هپاتیت B

میکرو RNAها (miRNAs) مولکول های کوچک (حدود ۲۲ نوکلئوتید) غیر کد کننده ای هستند که در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی نقش داشته و باعث مهار ترجمه mRNA می شود. برخی مطالعات نشان داده اند که miRNA سلولی می تواند تکثیر هپاتیت B و بیان ژنی را در سلول های کشت سلولی HepG2 تحت تأثیر قرار دهد. بر اساس نتایج به دست آمده دو miRNA موسوم به miR-199a-3p و miR-210 می توانند بیان ژن کد کننده HBsAg را سرکوب کنند.(۸۶) همچنین miR 125a-5p قادر است با بیان HBsAg مداخله کرده و مقدار HBsAg آزاد شده در محیط های کشت سلولی را کاهش دهد.(۸۷) اخیراً نیز تعدادی miRNA وابسته به سرطان شامل miR-15a/miR-16-1 و مجموعه miR-17-92 و miR-224 از طریق هدف قرار دادن mRNA هپاتیت B مانع تکثیر ویروس می گردد.(۹۰-۸۸)

علاوه بر عملکرد مستقیم miRNA های سلولی روی هپاتیت B، تعدادی از آن ها قادر هستند از طریق تنظیم تعدادی از فاکتورهای رونویسی تکثیر ویروس هپاتیت B را مهار کنند. miR-141 به طور چشم گیری از طریق هدف قراردادن رسپتور آلفا فعال کننده تکثیر پراکسی زوم می توانند بیان هپاتیت B و تکثیر سلول های HepG2 را سرکوب کنند.(۹۱) این در حالی است که miR-155 توسط هدف قرار دادن SOCS1 مانع عفونت هپاتیت B درسلول های هپاتومای انسانی می شود.(۹۲)

نقش عفونت های همزمان در عفونت نهفته HBV

طبق مطالعات گذشته عفونت HCV عامل مهمی در بروز OBI می باشد که حتی نقشی به مراتب بیشتر از HIV دارد.(۵) شیوع هپاتیت C در بیماران مبتلا به HBV متنوع بوده و بر اساس مناطق جغرافیایی مختلف تفاوت دارد. شیوع عفونت نهفته HBV در بیماران HCV مزمن تا بیش از ۵۲٪ گزارش شده است.(۵) مطالعات مختلف نشان داده اند که عفونت همزمان HBV و HCV منجر به کاهش همانندسازی HBV و همچنین

1. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
2. Epstein-Barr Virus
3. Histone deacetylase

کاهش بیان HBsAg در کبد می شود. علاوه بر این، عفونت مضاعف[1] HCV در شمپانزه های مبتلا به HBV منجر به کاهش میزان HBsAg در سرم می گردد.(۹۳) احتمالاً برهم کنش مولکولی دو ویروس هپاتوتروپیک در صورت عفونت همزمان باعث افزایش میزان حذف شدن HBsAg از سرم می شود.(۹۴) این یافته ها نشان دهنده این مطلب است که احتمال برهم کنش بین پروتئین های هر دو ویروس منجر به کاهش همانندسازی و ترشح پروتئین HBsAg می شود. مطالعات نشان داده است که پروتئین Core و NS2 ویروس هپاتیت C از طریق مداخله در چرخه زندگی HBV باعث بروز چنین پیامدهایی می گردد. این پروتئین ها می توانند باعث مهار همانندسازی و بیان ژنی HBV شده و همچنین فعالیت پروموترها و انهانسرهای HBV را سرکوب گردند.(۹۵و۹۶) برخی مطالعات نشان داده اند که عفونت همزمان HBV و HCV در مدل های حیوانی یا ترانسفکسن رپلیکون HCV و ژنوم HBV با طول کامل (به جای پروتئین های مستقل ویروسی) باعث بروز هیچگونه مداخله ای نمی شود.(۱۰۰-۹۷)

شیوع OBI در بیماران HIV مثبت بسیار متنوع بوده و بین ۸۹-۰٪ متغیر می باشد. علت این دامنه وسیع، نوع انتخاب بیمار، تکنیک به کار رفته برای تشخیص OBI، شیوع هپاتیت B آشکار در بین جوامع مختلف و همچنین تاریخچه درمان با داروهای ضد رتروویروسی می باشد. مطالعات اپیدمیولوژی شیوع OBI در بیماران HIV را قابل توجه گزارش کرده اند که این نتایج می دهند HIV نقش مهمی در بروز OBI دارد، گرچه مکانیسم مولکولی که این ویروس باعث القای OBI می شود شناخته نشده است. مطالعات نشان داده اند که HIV اثرات سیتوپاتیک مستقیمی روی بافت کبد دارد که غیروابسته به عفونت همزمان با ویروس های عامل هپاتیت می باشد. مطالعات گزارش کرده اند که HIV از طریق گیرنده های CCR5 و CXCR4 توانایی ورود به سلول های کبدی را دارد و بررسی های آزمایشگاهی حضور RNA ویروس و پروتئین P24 را در کبد ثابت کرده اند.(۱۰۱) به هر حال مکانیسم مولکولی که HIV چگونه در عفونت همزمان با HBV باعث القای تجمع HBsAg در سلول های کبدی می گردد همچنان مشخص نشده است.

عنوان شده است که عفونت HIV می تواند عامل مهمی در بروز OBI باشد که در نهایت منجر به علائم بالینی مداوم نسبت به علائم تحت بالینی می گردد.(۱۰۲) برخی مطالعات نشان داده اند که مصرف داروهای ضد رتروویروسی عامل مهمی در بروز OBI هستند. در واقع بیماران HIV مثبتی که این داروها را مصرف کرده بودند بیشتر در معرض ابتلا به عفونت نهفته HBV قرار دارند. برخی مطالعات نیز نشان داده اند که مصرف داروهای ضد HIV تأثیری در پاک شدن HBsAg و مهار ترشح آن به خون ندارد.(۱۰۵-۱۰۳) مطالعات دیگر نشان داده اند که HIV باعث افزایش ناچیز در مقدار مارکر آسیب کبدی آلانین آمینوترنسفراز می گردد.(۱۰۶و۱۰۷) به هر حال تیو[2] و همکاران نشان داده اند که آسیب کبدی در این بیماران به سرعت پیشرفت می کند که در نهایت می تواند منجر به سیروز گردد. باید توجه داشت که مرگ و میر در افراد HIV مثبت و HBsAg منفی به مراتب کمتر از افراد HIV مثبت و HBsAg مثبت می باشد که در این حالت آسیب کبدی بیشتر بوده و در نهایت بیماران با سرعت بیشتری به سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار مبتلا می گردند.(۱۰۸) نقش احتمالی عفونت همزمان با HIV-1، می تواند از طریق تغییرات روی فشار انتخابی باشد که ناشی از اختلال در سیستم ایمنی بیماران مبتلا به HIV-1 بوده و یکی از عواملی که شیوع OBI در این بیماران بالاست را می توان به همین عامل نسبت داد.

1. Superinfection
2. Thio

ادغام HBV-DNA در سلول میزبان

ژنوم HBV می تواند در سرتاسر ژنوم سلول میزبان ادغام گردد. مکانیسم های دقیق ادغام به طور دقیق مشخص نشده است. ویروس هپاتیت B حاوی آنزیم اینتگراز نیست (برخلاف HIV که حاوی آنزیم اینتگراز است). بر اساس مطالعات ادغام HBV-DNA به داخل ژنوم میزبان از طریق شکست در ژنوم سلول و یک حذف ۲۰۰ نوکلئوتیدی در انتهای ژنوم HBV صورت می گیرد. از آنجایی که HBV آنزیم اینتگراز را کد نمی کند، احتمال می رود آنزیم های سلولی به ویژه توپوایزومرازها در فرآیند ادغام ژنوم HBV در ژنوم سلول نقش دارند.(۱۰۹و۱۱۰) همان طور که پیشتر ذکر گردید مولکول cccDNA که حاوی چهار ORF است به عنوان الگویی برای سنتز mRNA های ویروسی عمل می کند. با این وجود پروموترهای موجود در ORF های ژنوم HBV پس از ادغام تا حدودی دچار تغییرات ساختاری و نوآرایی می شوند که در نتیجه آن اتصال فاکتورهای رونویسی مختلف دچار اختلال می گردد. در این میان رونویسی از ژن کد کننده HBsAg از اشکال ادغام شده HBV-DNA به علت تغییرات ساختاری در مقایسه با cccDNA تحت تأثیر قرار می گیرد.(۱۱۱) انهانسر I در هر دو حالت cccDNA و ژنوم ادغام شده به صورت فعال در فرآیند رونویسی نقش دارد. این انهانسر در سنتز پروتئین HBx ویروسی نقش داشته و از طریق مکانیسم های سلولی باعث کاهش یا مهار بیان پروتئین HBsAg می شود. در شکل cccDNA در چرخه زندگی HBV، پروتئین ۱۵۴ آمینواسیدی HBx از طریق یوبی کوئیتینه کردن[3] کمپلکس مهار رونویسی موسوم به SMC5/6 نقش مهمی را در بیان HBsAg ایفاء می کند. اما به علت تغییرات ساختاری در ژنوم ادغام شده HBV ایجاد مکانیسم قابل مشاهده نبوده و احتمالاً به علت فعالیت فاکتور SMC5/6 بیان HBsAg تحت تأثیر قرار می گیرد.(۱۱۲) در شکل ادغام شده ژنوم پروتئین HBx به خاطر حضور کدون پایان، سه آمینواسید کوچکتر از پروتئین تیپ وحشی ویروس کد می شود (۱۵۱ آمینواسید) و احتمالاً فقدان عملکرد این پروتئین روی کمپلکس SMC5/6 به این تغییرات نسبت داده می شود. برخلاف پروموتر ژن کد کننده HBsAg، پروموتر سایر پروتئین های انولپ (PreS1/PreS2) دچار تغییرات ساختاری نشده و در نهایت بیان آن ها در مقایسه با HBsAg افزایش می یابد. احتمالاً تغییر در نسبت رونوشت های ژن کد کننده HBsAg به ژن Pre-S منجر به مهار ترشح HBsAg می گردد.(۱۱۳) تغییرات ساختاری ژنوم ویروس در طی فرآیند ادغام می تواند منجر به کاهش یا مهار سنتز HBsAg شده و در نتیجه تولید ویریون و HBV-DNA در سرم به طور قابل توجهی کاهش می یابد. بنابراین ادغام ژنوم HBV می تواند نشان دهنده عامل مهمی در بروز OBI به ویژه طی مدت ها پس از عفونت مزمن مطرح باشد. همچنین بر اساس گزارش ها عفونت نهفته هپاتیت B می تواند به عنوان فاکتور خطر مهمی برای ابتلا به بیماری شدید کبدی و HCC باشد.(۱۱۴) در طی ادغام HBV-DNA به داخل سلول میزبان ژن کد کننده Core اغلب در این فرآیند دچار نقص بوده و در نهایت منجر به عدم سنتز کافی پروتئین Core می گردد. کمبود یا از دست رفتن پروتئین Core ویروس باعث نقص گردهمایی (اسمبلی)

3. Ubiquitination

و تجمع HBV-DNA غیر کپسیده در داخل سلول های کبدی می شود و می تواند عاملی برای توجیه کاهش بار ویروسی در بیماران مبتلا به HCC و احتمالاً در بیماران OBI باشد.(۱۱۵)

روش های تشخیص OBI

عفونت نهفته هپاتیت B نوعی از عفونت مزمن HBV است که توسط واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) قابل تشخیص بوده و بر اساس حضور آنتی بادی علیه پروتئین Core (و HBsAg) به دو نوع عفونت سروپوزیتیو و سرونگاتیو دسته بندی می شود.(۱۱۶) بنابراین نوع تکنیک های مورد استفاده، حساسیت آن ها و همچنین نوع نمونه های بالینی در تشخیص عفونت نهفته هپاتیت B اهمیت فراوانی دارد. تفاوت ها بین روش های تشخیصی تجاری در توانایی تشخیص HBsAg با شناسایی موتاسیون در منطقه MHR و به ویژه ناحیه "a" determinant مرتبط است. روش های مورد استفاده با آنتی بادی پلی کلونال برای تشخیص موتانت HBsAg متفاوت است. کیت های تجاری سرولوژیک که برای تشخیص HBsAg مورد استفاده قرار می گیرد بر پایه آنتی بادی های پلی کلونال بوده و از این نظر امکان عدم تشخیص موتانت های فرار از تشخیص را مرتفع می کند.(۵) علاوه بر اهمیت مارکر HBsAg، مطالعات مختلفی نشان داده اند که شیوع OBI در افرادی که از نظر هر دو مارکر Anti-HBc و Anti-HBs مثبت هستند بیشتر از افرادی است که از نظر این مارکرهای سرولوژی منفی می باشد (۸۰-۴۶ درصد در مقابل ۵۰-۲۰ درصد) و همچنین فراوانی بالایی از HBV-DNA در افرادی که تنها از نظر Anti-HBc مثبت هستند مشاهده شده است (۱۰ تا ۸۰ درصد) (۲۰و۲۵) و نشان می دهد که این آنتی بادی نمی تواند در حذف کامل HBV نقش مؤثری داشته باشد. (۱۱۷) با گذشت زمان مارکرهای آنتی بادی ممکن است غیرقابل تشخیص شوند و HBV-DNA به عنوان تنها مارکر عفونت بر جای بماند. با این وجود در همه موارد، سطح سرمی ویروس پایین است. در بیماران OBI، سطح سرمی HBV-DNA معمولاً کمتر از محدوده قابل مشاهده[1] (LOD) اغلب روش های تشخیصی کمی است.(۱۱۸) آزمون های کمی PCR روش مناسبی برای تشخیص OBI هستند. جهت اهداف تحقیقاتی و برای اجتناب از به دست آمدن نتایج کاذب منفی و کاذب مثبت، استفاده از پرایمرهای اختصاصی که حداقل سه ناحیه ژنومی HBV (شامل ژن های X، S و Core) را هدف قرار می دهد باید مورد استفاده قرار گیرد.(۱۹)

بدون شک برای تشخیص عفونت آنالیز استخراج DNA از کبد صحیح ترین روش شناسائی می باشد و استاندارد طلایی تشخیص انجام تکنیک Nested –PCR یا Real time PCR بر روی DNA استخراج شده از کبد یا خون می باشد. روش های متفاوتی در دنیا برای غربالگری خون و محصولات خونی استفاده می شود. افراد مبتلا به OBI به صورت بالقوه می توانند عفونت HBV را از طریق خون منتقل کنند. در صورت عدم تشخیص و استفاده از تکنیک های حساس مولکولی، عفونت OBI می تواند عامل آلودگی افراد به هپاتیت B بعد از انتقال خون باشد.(۳۴) اگرچه بررسی HBV-DNA در بافت کبد استاندارد طلایی برای تشخیص OBI است، به هر حال تعیین ژنوم ویروس در نمونه های سرم یا پلاسما روشی آسان تر و غیرتهاجمی بوده و می توان از گروه های بیمار مختلفی تهیه کرد.(۱۹) در یک مطالعه ای در آلمان، از میان ۳۰۰۴ اهداء کننده خون تعداد ۵۵۲ (۱۸/۴ ٪) از نظر مارکر Anti-HBc مثبت بودند که از این میان ۴۴ نفر (۸ ٪) مبتلا به OBI در سرم خود بودند بودند، با این وجود پس از بررسی ۳۹ بیوپسی کبد از همان بیماران ۴۱ ٪ مبتلا به OBI بودند.(۱۱۹) مطالعات دیگری در ایران که روی نمونه های سرم و سلول های تک هسته ای خون محیطی[2] (PBMCs) انجام گردید به ترتیب واریانس ۲۰ ٪ و ۳۲/۶ ٪ را در تشخیص OBI مشخص نمود.(۱۲۰)

روی هم رفته واریانس شیوع OBI به حساسیت نسبی هر دو روش های تشخیص سرولوژیک و مولکولی بستگی دارد. شیوع عفونت مزمن HBV و قابلیت استفاده از منابع عمده تشخیصی می تواند برای غربال گری HBV استفاده شود. برای مثال HBsAg با anti-HBc و یا آزمون حساس Nucleic acid amplification test برای غربال گری منابع غنی از عفونت HBV با شیوع پایین عفونت مزمن HBV استفاده می شود.

نتیجه گیری

مکانیسم های درگیر در بروز عفونت نهفته ویروس هپاتیت B به طور کامل مشخص نشده است. به هر حال نتایج به دست آمده از مطالعات نشان داده است که علاوه بر فاکتورهای ویروسی که می توانند در عفونت نهفته نقش داشته باشند، مکانیسم های مرتبط با میزبان (نظیر پاسخ ایمنی و اپی ژنتیک) می توانند نقش کلیدی در کنترل همانندسازی هپاتیت B ایفاء نمایند. این مکانیسم های مولکولی از جنبه بالینی اهمیت زیادی دارند، به خصوص وقتی که تغییرات محیطی باعث از بین رفتن تعادل ویروس/میزبان می شود، ممکن است منجر به فعال شدن مجدد ویروس شده و باعث پیشرفت بیماری به سمت هپاتیت B حاد گردد. این حالت ممکن است زمانی رخ دهد که بیماران مبتلا به OBI داروهای سرکوب کننده ایمنی یا داروهایی که با کدهای اپی ژنتیکی مداخله می کنند استفاده می کنند. همچنین HBV موجود در سرم بیماران مبتلا به OBI توانایی تکثیر داشته و از این رو می تواند به سایر افراد سرایت کند.

1. Limit of detection

2. Peripheral blood mononuclear cells

REFERENCES:

1. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 2015;386:1546-55.
2. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 2012;30:2212-9.
3. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012;57:167-85.
4. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2017;67:370-98.

5. Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:142-63.
6. Hu J, Liu K. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses* 2017;9. pii: E56.
7. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68.
8. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology* 2015;479-480:672-86.
9. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* 2007;11:685-706, vii.
10. Shi YH. Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes. *Jpn J Infect Dis* 2012;65:476-82.
11. Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res* 2016;2:163-86.
12. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012;1:e00049.
13. Revill PA, Locarnini SA. New perspectives on the hepatitis B virus life cycle in the human liver. *J Clin Invest* 2016;126:833-6.
14. Karayiannis P. Hepatitis B virus: virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatol Int* 2017;11:500-8.
15. Yang R, Song G, Guan W, Wang Q, Liu Y, Wei L. The Lumipulse G HBsAg-Quant assay for screening and quantification of the hepatitis B surface antigen. *J Virol Methods* 2016;228:39-47.
16. Said ZN. An overview of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2011;17:1927-38.
17. Zobeiri M. Occult hepatitis B: clinical viewpoint and management. *Hepat Res Treat* 2013;2013:259148.
18. Santos EA, Yoshida CF, Rolla VC, Mendes JM, Vieira IF, Arabe J, et al. Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:92-8.
19. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2008;49:652-7.
20. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology* 2001;34:194-203.
21. Fang ZL, Zhuang H, Wang XY, Ge XM, Harrison TJ. Hepatitis B virus genotypes, phylogeny and occult infection in a region with a high incidence of hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2004;10:3264-8.
22. Allain JP. Global epidemiology of occult HBV infection. *Ann Blood* 2017;2:1-13.
23. Ahmad Akhoundi MS, Momeni N, Norouzi M, Ghalichi L, Shamshiri AR, Alavian SM, et al. Prevalence of blood-borne viruses among Iranian dentists: Results of a national survey. *Int J Occup Med Environ Health* 2015;28:593-602.
24. Borzooy Z, Jazayeri SM, Mirshafiey A, Khamseh A, Mahmoudie MK, Azimzadeh P, et al. Identification of occult hepatitis B virus (HBV) infection and viral antigens in healthcare workers who presented low to moderate levels of anti-HBs after HBV vaccination. *Germs* 2015;5:134-40.
25. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999;341:22-6.
26. De Maria N, Colantoni A, Friedlander L, Leandro G, Idilman R, Harig J, et al. The impact of previous HBV infection on the course of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3529-36.
27. Momosaki S, Nakashima Y, Kojiro M, Tabor E. HBsAg-negative hepatitis B virus infections in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2005;12:325-9.
28. Squadrito G, Pollicino T, Cacciola I, Caccamo G, Villari D, La Masa T, et al. Occult hepatitis B virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cancer* 2006;106:1326-30.
29. Kalantari H, Ferdowsi F, Yaran M. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res* 2016;5:151.
30. Jain P, Nijhawan S. Occult hepatitis C virus infection is more common than hepatitis B infection in maintenance hemodialysis patients. *World J Gastroenterol* 2008;14:2288-9.
31. Aghakhani A, Banifazl M, Kalantar E, Eslamifar A, Ahmadi F, Razeghi E, et al. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with isolated hepatitis B core antibody: a multicenter study. *Ther Apher Dial* 2010;14:349-53.
32. Shahmoradi S, Yahyapour Y, Mahmoodi M, Alavian SM, Fazeli Z, Jazayeri SM. High prevalence of occult hepatitis B virus infection in children born to HBsAg-positive mothers despite prophylaxis with hepatitis B vaccination and HBIG. *J Hepatol* 2012;57:515-21.
33. Mohraz M, Jafari R, Poortahmasebi V, Sadeghi A, Hajabdolbaghi M, Rasoolinejad M, et al. Molecular analysis of occult hepatitis B infection among Iranian HIV-positive patients. *Future Virol* 2016;11:497-508.
34. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2007;46:160-70.
35. Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002;9:243-57.
36. Ifeanyi O, Uzoma O. Occult Hepatitis B infection and immunity. *Inter J Curr Res Med Sci* 2016;3:89-100.
37. Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, Pollicino T. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol* 2013;35:39-52.

38. Wands JR, Chura CM, Roll FJ, Maddrey WC. Serial studies of hepatitis-associated antigen and antibody in patients receiving antitumor chemotherapy for myeloproliferative and lymphoproliferative disorders. *Gastroenterology* 1975;68:105-12.

39. Raimondo G, Filomia R, Maimone S. Therapy of occult hepatitis B virus infection and prevention of reactivation. *Intervirology* 2014;57:189-95.

40. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, Bertoletti A, Pilli M, et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 1996;98:1185-94.

41. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 1996;2:1104-8.

42. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004;126:1750-8.

43. Wong DK, Fung J, Lee CK, Seto WK, Leung J, Huang FY, et al. Intrahepatic hepatitis B virus replication and liver histology in subjects with occult hepatitis B infection. *Clin Microbiol Infect* 2016;22:290 e1-3.

44. Zerbini A, Pilli M, Boni C, Fisicaro P, Penna A, Di Vincenzo P, et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2008;134:1470-81.

45. Lumley SF, McNaughton AL, Klenerman P, Lythgoe KA, Matthews PC. Hepatitis B Virus Adaptation to the CD8+ T Cell Response: Consequences for Host and Pathogen. *Front Immunol* 2018;9:1561.

46. Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J Gastroenterol* 2007;13:5682-6.

47. Bes M, Vargas V, Piron M, Casamitjana N, Esteban JI, Vilanova N, et al. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *J Hepatol* 2012;56:765-74.

48. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91.

49. Lucifora J, Durantel D, Testoni B, Hantz O, Levrero M, Zoulim F. Control of hepatitis B virus replication by innate response of HepaRG cells. *Hepatology* 2010;51:63-72.

50. Chang J, Block TM, Guo JT. The innate immune response to hepatitis B virus infection: implications for pathogenesis and therapy. *Antiviral Res* 2012;96:405-13.

51. Williams JB, Huppner A, Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Differential Expression of Woodchuck Toll-Like Receptors 1-10 in Distinct Forms of Infection and Stages of Hepatitis in Experimental Hepatitis B Virus Infection. *Front Microbiol* 2018;9:3007.

52. Ramezani A, Banifazl M, Mamishi S, Sofian M, Eslamifar A, Aghakhani A. The influence of human leukocyte antigen and IL-10 gene polymorphisms on hepatitis B virus outcome. *Hepat Mon* 2012;12:320-5.

53. Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G. Serum Levels of IL-10 and IL-17A in Occult HBV-Infected South-East Iranian Patients. *Hepat Mon* 2010;10:31-5.

54. Zhu HL, Li X, Li J, Zhang ZH. Genetic variation of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2016;22:3531-46.

55. Weber B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. *J Med Virol* 2006;78 Suppl 1:S59-65.

56. Waters JA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, et al. Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* 1992;90:2543-7.

57. Ponsel D, Bruss V. Mapping of amino acid side chains on the surface of hepatitis B virus capsids required for envelopment and virion formation. *J Virol* 2003;77:416-22.

58. Alavian SM, Carman WF, Jazayeri SM. HBsAg variants: diagnostic-escape and diagnostic dilemma. *J Clin Virol* 2013;57:201-8.

59. Weinberger KM, Bauer T, Bohm 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;81:1165-74.

60. Mello FC, Martel N, Gomes SA, Araujo NM. Expression of Hepatitis B Virus Surface Antigen Containing Y100C Variant Frequently Detected in Occult HBV Infection. *Hepat Res Treat* 2011;2011:695859.

61. Hsu CW, Yeh CT, Chang ML, Liaw YF. Identification of a hepatitis B virus S gene mutant in lamivudine-treated patients experiencing HBsAg seroclearance. *Gastroenterology* 2007;132:543-50.

62. 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;60:113-21.

63. Bock CT, Tillmann HL, Torresi J, Klempnauer J, Locarnini S, Manns MP, et al. Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation. *Gastroenterology* 2002;122:264-73.

64. Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology* 2004;127:1356-71.

65. Fang Y, Teng X, Xu WZ, Li D, Zhao HW, Fu LJ, et al. Molecular characterization and functional analysis of occult hepatitis B virus infection in Chinese patients infected with genotype C. *J Med Virol* 2009;81:826-35.

66. Fan YF, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT,

et al. Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. *Hepatology* 2001;33:277-86.

67. Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *J Hepatol* 2014;61:408-17.

68. Bonvin M, Greeve J. Hepatitis B: modern concepts in pathogenesis--APOBEC3 cytidine deaminases as effectors in innate immunity against the hepatitis B virus. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:298-303.

69. Turelli P, Mangeat B, Jost S, Vianin S, Trono D. Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 2004;303:1829.

70. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 2014;343:1221-8.

71. Vartanian JP, Henry M, Marchio A, Suspene R, Aynaud MM, Guetard D, et al. Massive APOBEC3 editing of hepatitis B viral DNA in cirrhosis. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000928.

72. Vivekanandan P, Kannangai R, Ray SC, Thomas DL, Torbenson M. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of occult hepatitis B from liver tissue samples. *Clin Infect Dis* 2008;46:1227-36.

73. Knipe DM, Lieberman PM, Jung JU, McBride AA, Morris KV, Ott M, et al. Snapshots: chromatin control of viral infection. *Virology* 2013;435:141-56.

74. Arvey A, Tempera I, Tsai K, Chen HS, Tikhmyanova N, Klichinsky M, et al. An atlas of the Epstein-Barr virus transcriptome and epigenome reveals host-virus regulatory interactions. *Cell Host Microbe* 2012;12:233-45.

75. Gunther T, Grundhoff A. The epigenetic landscape of latent Kaposi sarcoma-associated herpesvirus genomes. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000935.

76. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;51:581-92.

77. Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, et al. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* 1995;69:3350-7.

78. Bock CT, Schranz P, Schroder CH, Zentgraf H. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* 1994;8:215-29.

79. Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol* 2001;307:183-96.

80. Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology* 2006;130:823-37.

81. Liu F, Campagna M, Qi Y, Zhao X, Guo F, Xu C, et al. Alpha-interferon suppresses hepadnavirus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003613.

82. Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, et al. IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest* 2012;122:529-37.

83. Keasler VV, Hodgson AJ, Madden CR, Slagle BL. Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. *J Virol* 2007;81:2656-62.

84. Zhang X, Hou J, Lu M. Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. *Front Genet* 2013;4:202.

85. Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M. Hepatitis B viral DNA is methylated in liver tissues. *J Viral Hepat* 2008;15:103-7.

86. Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, Liu M, Li X, Tang H. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res* 2010;88:169-75.

87. Potenza N, Papa U, Mosca N, Zerbini F, Nobile V, Russo A. Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. *Nucleic Acids Res* 2011;39:5157-63.

88. Wang Y, Jiang L, Ji X, Yang B, Zhang Y, Fu XD. Hepatitis B viral RNA directly mediates down-regulation of the tumor suppressor microRNA miR-15a/miR-16-1 in hepatocytes. *J Biol Chem* 2013;288:18484-93.

89. Jung YJ, Kim JW, Park SJ, Min BY, Jang ES, Kim NY, et al. c-Myc-mediated overexpression of miR-17-92 suppresses replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *J Med Virol* 2013;85:969-78.

90. Scisciani C, Vossio S, Guerrieri F, Schinzari V, De Iaco R, D'Onorio de Meo P, et al. Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NFkappaB inflammatory pathways. *J Hepatol* 2012;56:855-61.

91. Hu W, Wang X, Ding X, Li Y, Zhang X, Xie P, et al. MicroRNA-141 represses HBV replication by targeting PPARA. *PLoS One* 2012;7:e34165.

92. Su C, Hou Z, Zhang C, Tian Z, Zhang J. Ectopic expression of microRNA-155 enhances innate antiviral immunity against HBV infection in human hepatoma cells. *Virol J* 2011;8:354.

93. Bradley DW, Maynard JE, McCaustland KA, Murphy BL, Cook EH, Ebert JW. Non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: interference with acute hepatitis A virus and chronic hepatitis B virus infections. *J Med Virol* 1983;11:207-13.

94. Sheen IS, Liaw YF, Lin DY, Chu CM. Role of hepatitis C and delta viruses in the termination of chronic hepatitis B surface antigen carrier state: a multivariate analysis in a longitudinal follow-up study. *J Infect Dis* 1994;170:358-61.

95. Chen SY, Kao CF, Chen CM, Shih CM, Hsu MJ, Chao CH, et al. Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 2003;278:591-607.

96. Dumoulin FL, von dem Bussche A, Li J, Khamzina L, Wands JR, Sauerbruch T, et al. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* 2003;305:260-6.

97. Bellecave P, Gouttenoire J, Gajer M, Brass V, Koutsoudakis G, Blum HE, et al. Hepatitis B and C virus coinfection: a novel model system reveals the absence of direct viral interference. *Hepatology* 2009;50:46-55.

98. Eyre NS, Phillips RJ, Bowden S, Yip E, Dewar B, Locarnini SA, et al. Hepatitis B virus and hepatitis C virus interaction in Huh-7 cells. *J Hepatol* 2009;51:446-57.

99. Yang D, Zuo C, Wang X, Meng X, Xue B, Liu N, et al. Complete replication of hepatitis B virus and hepatitis C virus in a newly developed hepatoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E1264-73.

100. Wieland SF, Asabe S, Engle RE, Purcell RH, Chisari FV. Limited hepatitis B virus replication space in the chronically hepatitis C virus-infected liver. *J Virol* 2014;88:5184-8.

101. Housset C, Lamas E, Brechot C. Detection of HIV1 RNA and p24 antigen in HIV1-infected human liver. *Res Virol* 1990;141:153-9.

102. Compston LI, Li C, Sarkodie F, Owusu-Ofori S, Opare-Sem O, Allain JP. Prevalence of persistent and latent viruses in untreated patients infected with HIV-1 from Ghana, West Africa. *J Med Virol* 2009;81:1860-8.

103. Tramuto F, Maida CM, Colomba GM, Di Carlo P, Vitale F. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in a cohort of HIV-positive patients resident in Sicily, Italy. *Biomed Res Int* 2013;2013:859583.

104. Bagaglio S, Porrino L, Lazzarin A, Morsica G. Molecular characterization of occult and overt hepatitis B (HBV) infection in an HIV-infected person with reactivation of HBV after antiretroviral treatment interruption. *Infection* 2010;38:417-21.

105. Morsica G, Ancarani F, Bagaglio S, Maracci M, Cicconi P, Cozzi Lepri A, et al. Occult hepatitis B virus infection in a cohort of HIV-positive patients: correlation with hepatitis C virus coinfection, virological and immunological features. *Infection* 2009;37:445-9.

106. Colin JF, Cazals-Hatem D, Loriot MA, Martinot-Peignoux M, Pham BN, Auperin A, et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on chronic hepatitis B in homosexual men. *Hepatology* 1999;29:1306-10.

107. Thio CL. Hepatitis B in the human immunodeficiency virus-infected patient: epidemiology, natural history, and treatment. *Semin Liver Dis* 2003;23:125-36.

108. Thio CL, Seaberg EC, Skolasky R Jr, Phair J, Visscher B, Munoz A, et al. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). *Lancet* 2002;360:1921-6.

109. Yang W, Summers J. Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor. *J Virol* 1999;73:9710-7.

110. Bill CA, Summers J. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11135-40.

111. Hai H, Tamori A, Kawada N. Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2014;20:6236-43.

112. Decorsiere A, Mueller H, van Breugel PC, Abdul F, Gerossier L, Beran RK, et al. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* 2016;531:386-9.

113. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-45.

114. Coppola N, Onorato L, Iodice V, Starace M, Minichini C, Farella N, et al. Occult HBV infection in HCC and cirrhotic tissue of HBsAg-negative patients: a virological and clinical study. *Oncotarget* 2016;7:62706-14.

115. Raimondo G, Burk RD, Lieberman HM, Muschel J, Hadziyannis SJ, Will H, et al. Interrupted replication of hepatitis B virus in liver tissue of HBsAg carriers with hepatocellular carcinoma. *Virology* 1988;166:103-12.

116. Makvandi M. Update on occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2016;22:8720-34.

117. Carman WF, Boner W, Fattovich G, Colman K, Dornan ES, Thursz M, et al. Hepatitis B virus core protein mutations are concentrated in B cell epitopes in progressive disease and in T helper cell epitopes during clinical remission. *J Infect Dis* 1997;175:1093-100.

118. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002;2:479-86.

119. Knoll A, Hartmann A, Hamoshi H, Weislmaier K, Jilg W. Serological pattern "anti-HBc alone": characterization of 552 individuals and clinical significance. *World J Gastroenterol* 2006;12:1255-60.

120. Vakili Ghartavol Z, Alavian SM, Amini S, Vahabpour R, Bahramali G, Mostafavi E, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus in plasma and peripheral blood mononuclear cell compartments of patients with chronic hepatitis C infection in tehran-iran. *Hepat Mon* 2013;13:e10134.