بسم الله الرحمن الرحیم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه علم و فرهنگ

دانشکده علوم و فناوری‌های نوین زیستی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی– گرایش علوم سلولی و ملکولی

بررسی جهش CCR5-Δ32 و پلی‌مرفیسم CCR5-59353(C/T) در بیماران ایرانی مبتلا به هپاتیت مزمن B

نگارش

سجّاد جلالی خوزانی

استاد راهنما

دکتر زهره شریفی

اساتید مشاور

دکتر محمدحسین صنعتی

دکتر سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی

آبانماه ۱۳۹۲

تقدیم به

تمامی جویندگان علم و دانش

الهی ادای شکر تو را هیچ زبان نیست و دریای لطف تو را هیچ کران

هدایت کن بر ما رهی که بهتر از آن نیست...

با سپاس فراوان از سرکار خانم دکتر زهره شریفی استاد راهنمای عزیز که همواره و بی دریغ با منش بزرگوارانه خود راهنما و پاسخگوی بنده بودند.

همچنین از اساتید بزرگوار دکتر محمد حسین صنعتی و دکتر سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی که غیر از زحمت مشاوره، در طول تحصیل بنده را از دانش و تجربه خود بهره‌مند ساختند کمال تشکر را دارم.

و بهترین درودها را نثار پدر و مادر گرانقدرم می کنم که مرا تا این لحظه زندگی در سایه لطف و عنایت بی شائبه خویش پروراندند و خود همچون شمع سوختند تا فرزندشان رشد کند.

و در آخر، بالاترین سپاس‌ها از برای همسر عزیزم که وجودش گرمابخش وجودم بوده و هست.

چکیده

زمینه و هدف: CCR5 یکی از مهمترین گیرنده‌های کموکاینی است که در فراخواندن سلول‌های ایمنی اختصاصی (نظیر: سلول‌های T سایتوتوکسیک و سلول‌های NK) ضدویروسی به کبد نقش دارد. CCR5-Δ32 و CCR5-59353(C/T) دو پلی‌مرفیسم بسیار مهم در ژن *CCR5* هستند و در برخی مطالعات گزارش گردیده که ممکن است با پاکسازی و یا تداوم عفونت مزمن HBV مرتبط باشند. لذا این مطالعه جهت بررسی دو پلی‌مرفیسم مذکور در بیماران ایرانی با هدف یافتن ارتباط آن‌ها با فرم مزمن بیماری هپاتیت B انجام گردید.

روش‌ها: ۱۰۰ بیمار HBsAg مثبت و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان شاهد به طور تصادفی انتخاب شدند. نمونه‌های خون افراد از نظر HBsAg بوسیله تکنیک الایزا و از نظر HBV-DNA توسط PCR ارزیابی شدند. DNA ژنومی با روش نمک اشباع از بافی‌کوت استخراج شد و سپس ژنوتایپ‌ها به کمک PCR معمولی برای CCR5-Δ32 و روش PCR اختصاصی آلل (ASA-PCR) برای CCR5-59353 تعیین شدند. برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون رگرسیون لجستیک استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج این مطالعه هیچ‌کدام از نمونه‌ها در گروه شاهد و بیمار دارای جهش CCR5-Δ32 نبودند. همچنین فراوانی آلل موتانت C مربوط به پلی‌مرفیسم 59353- در افراد مبتلا به عفونت مزمن HBV برابر ۵۴٪ و در افراد سالم ۵۰/۵٪ بود و فراوانی ژنوتایپ CC در بیماران ۱۲٪ و در گروه شاهد ۵٪ بود. لذا هیچ تفاوت معنی‌داری در فراوانی‌های آللی و ژنوتایپی در دو گروه شاهد و بیمار مشاهده نگردید (به ترتیب $P=$ ۰/۴۸۴ و $P=$۰/۵۲۸).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری در فراوانی‌های پلی‌مرفیسم‌های CCR5-Δ32 و CCR5-59353 میان گروه‌های شاهد و بیمار وجود ندارد، بنابراین ارتباطی بین پلی‌مرفیسم‌های مذکور با تداوم عفونت HBV در بیماران ایرانی وجود ندارد.

واژگان کلیدی: CCR5؛ جهش Δ32، CCR5-59353، هپاتیت مزمن B، PCR اختصاصی آلل (ASA-PCR)

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۱ - فصل اول- مقدمه وکلیات **۱**

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۱-۱- بیماری هپاتیت B ۱

۱-۱-۲- تاریخچه هپاتیت B ۲

۱-۱-۳- ساختار ویروس‌شناسی مولکولی ۳

۱-۱-۳-۱- طبقه‌بندی ۳

۱-۱-۳-۲- ساختمان ویروس ۴

۱-۱-۳-۳- آنتی‌ژن‌های HBV ۶

۱-۱-۳-۴- سویه ها و ژنوتایپ‌ها ۶

۱-۱-۳-۵- ژنوم ویروس ۷

۱-۱-۴- چرخه زندگی ویروس ۹

۱-۱-۵- اپیدمیولوژی HBV ۱۱

۱-۱-۵-۱- اپیدمیولوژی در ایران ۱۲

۱-۱-۶- ویروس شناسی پزشکی ۱۳

۱-۱-۶-۱- راه‌های انتقال عفونت HBV ۱۳

۱-۱-۶-۲- علایم بالینی ۱۴

۱-۱-۶-۳- عفونت حاد ۱۵

۱-۱-۶-۴- عفونت مزمن ۱۵

۱-۱-۶-۵- پیشگیری ۱۷

۱-۱-۶-۶- درمان ۱۷

۱-۱-۷- یافته‌های آزمایشگاهی ۲۰

۱-۱-۷-۱- تشخیص‌های سرولوژیک ۲۰

۱-۱-۷-۲- آزمایش‌های مولکولی ۲۳

۱-۱-۸- کموکاین‌ها ۲۴
۱-۱-۹- کموکاین رسپتورها ۲۸
۱-۱-۹-۱- ساختار کموکاین رسپتورها ۲۸
۱-۱-۹-۲- Chemokine (C-C motif) receptor 5 ..... ۲۹
۱-۲- اهداف و ضرورتهای انجام تحقیق ۳۳
۱-۲-۱- هدف کلی ۳۳
۱-۲-۲- اهداف جزیی ۳۳
۱-۲-۳- ضرورت های تحقیق ۳۳
۲- *فصل دوم- مواد و روش‌ها* ۳۴
۲-۱- جامعه مورد مطالعه ۳٤
۲-۲- مواد و وسایل مورد نیاز ۳۵
۲-۳- روش‌ها ۳۶
۲-۳-۱- جمع‌آوری نمونه ۳۶
۲-۳-۲- جداسازی لایه بافی‌کوت و نگهداری نمونه‌ها ۳۶
۲-۳-۳- استخراج DNA ژنومی به روش Salting out ۳۶
۲-۳-۳-۱- آماده‌سازی محلول‌ها ۳۶
۲-۳-۳-۲- مواد و تجهیزات مورد استفاده ۳۷
۲-۳-۳-۳- مراحل استخراج ۳۸
۲-۳-۴- سنجش خلوص DNA ۳۹
۲-۳-۴-۱- مواد و تجهیزات مورد نیاز ۳۹
۲-۳-۴-۲- روش کار ۳۹
۲-۳-۵- تکثیر DNA توسط PCR ۴۰

۲-۳-۵-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ۴۰
۲-۳-۵-۲- مراحل PCR ۴۱
الف- PCR برای CCR5-Δ32 ..... ۴۱
ب- ASA-PCR برای CCR5-59353 ..... ۴۳
۲-۳-۶- بررسی محصولات PCR بوسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۴۵
۲-۳-۶-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ۴۵
۲-۳-۶-۲- تهیه ژل آگارز ۴۶
۲-۳-۶-۳- نحوه لود کردن نمونه ها ۴۷
۲-۳-۷- آنالیز آماری داده‌ها ۴۷
۳- *فصل سوم- یافته‌ها* ۴۸
۳-۱- بررسی فراوانی CCR5-Δ32 و CCR5-59353 در جمعیت مورد مطالعه ۴۸
۳-۱-۱- جهش CCR5-Δ32 ..... ۴۸
۳-۱-۱-۱- نتایج PCR ۴۸
۳-۱-۱-۲- آنالیز آماری ۴۹
۳-۱-۲- پلی‌مرفیسم CCR5-59353 ..... ۵۰
۳-۱-۲-۱- نتایج PCR ۵۰
۳-۱-۲-۲- آنالیز آماری ۵۲
۳-۲- بررسی متغیرهای زمینه‌ای ۵۳
۳-۲-۱- جنسیت ۵۳
۳-۲-۲- سن ۵۳
۳-۲-۳- وضعیت تاهل ۵۵
۳-۲-۴- سطح تحصیلات ۵۶
۳-۲-۵- شغل ۵۸
۳-۲-۶- بررسی فاکتورهای خطر در بیماران ۶۰
۳-۳- بررسی تاثیر متغیرهای زمینه‌ای ۶۱

۳-۳-۱- ارتباط بین CCR5-Δ32 و CCR5-59353 با جنسیت در گروه‌های شاهد و بیمار ۶۱
۳-۳-۲- رابطه سن افراد با ابتلا به بیماری هپاتیت B ۶۲
۳-۳-۳- رابطه وضعیت تاهل افراد با ابتلا به بیماری هپاتیت B ۶۳
۳-۳-۴- رابطه سطح تحصیلات افراد با ابتلا به بیماری هپاتیت B ۶۳
۳-۳-۵- رابطه شغل افراد با ابتلا به بیماری هپاتیت B ۶۴
۳-۳-۶- رابطه فاکتورهای خطر در افراد بیمار با ابتلا به بیماری هپاتیت B ۶۵
۴- *فصل چهارم- بحث و نتیجه‌گیری* ۶۶
۴-۱- بحث ۶۶
۴-۲- نتیجه‌گیری ۷۱
۴-۳- پیشنهادات ۷۱
۵- *فصل پنجم- منابع*..... ۷۲
۵-۱- منابع فارسی ۷۲
۵-۲- منابع انگلیسی ۷۲
***پیوست الف- توضیحی بر روش تکثیر و آشکارسازی DNA ویروسی*..... ۸۳**

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۱-۱- تفسیر مارکرهای ویروس هپاتیت B ۲۰

جدول۲-۱- تجهیزات روتین مورد استفاده در تمام مراحل ۳۵

جدول۲-۲- تجهیزات مورد استفاده برای استخراج DNA ۳۷

جدول۲-۳- تجهیزات مورد استفاده برای PCR ۴۰

جدول۲-۴- توالی جفت پرایمر استفاده شده برای ژنوتایپینگ پلی مورفیسم CCR5-Δ32 ..... ۴۱

جدول۲-۵- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR به منظور شناسایی جهش CCR5-Δ32 ..... ۴۲

جدول۲-۶- برنامه دستگاه ترموسایکلر به‌منظور انجام PCR برای شناسایی جهش CCR5-Δ32 ..... ۴۲

جدول۲-۷- توالی دو جفت پرایمر استفاده شده برای ژنوتایپینگ پلی‌مورفیسم (C/T) CCR5-59353 ..... ۴۴

جدول۲-۸- برنامه دستگاه ترموسایکلر به‌منظور انجام PCR برای شناسایی پلی‌مرفیسم CCR5-59353 ..... ۴۴

جدول ۲-۹- تجهیزات مورد نیاز به منظور تهیه ژل و انجام الکتروفورز ۴۵

جدول۳-۱- فراوانی آللی و ژنوتایپی پلی‌مرفیسم CCR5-59353 در گروه‌های شاهد و بیمار ۵۰

جدول ۳-۲- ارتباط بین آلل‌ها و ژنوتایپ‌ها با بیماری هپاتیت مزمن B ۵۲

جدول ۳-۳- فراوانی بر اساس سن افراد به تفکیک گروه‌های شاهد و بیمار ۵۴

جدول۳-۴- فراوانی بر اساس سطح تحصیلات افراد به تفکیک گروه‌های شاهد و بیمار ۵۷

جدول۳-۵- فراوانی بر اساس شغل افراد به تفکیک گروه‌های شاهد و بیمار ۵۸

جدول ۳-۶- فراوانی گروه بیماران از نظر فاکتور های خطر ۶۰

جدول۳-۷- توزیع CCR5-Δ32 و CCR5-59353 در مرد و زن ۶۱

جدول ۳-۸- ارتباط بین فاکتور سن با ابتلا به بیماری هپاتیت B ۶۲

جدول ۳-۹- ارتباط بین سطح تحصیلات با ابتلا به بیماری هپاتیت B ۶۳

جدول ۳-۱۰- ارتباط بین شغل افراد با ابتلا به بیماری هپاتیت B ۶۴

جدول ۳-۱۱- ارتباط بین فاکتورهای خطر در بیماران با ابتلا به بیماری هپاتیت B ۶۵

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱- فراوانی ژنوتیپ‌های پلی‌مرفیسم CCR5-59353 در گروه شاهد و بیمار ۵۱
نمودار ۳-۲- درصد فراوانی بر اساس جنسیت افراد به تفکیک گروه‌های شاهد و بیمار ۵۳
نمودار ۳-۳- درصد فراوانی بر اساس سن افراد به تفکیک گروه‌های شاهد و بیمار ۵۵
نمودار ۳-۴- درصد فراوانی بر اساس وضعیت تاهل افراد به تفکیک گروه‌های شاهد و بیمار ۵۶
نمودار ۳-۵- درصد فراوانی بر اساس سطح تحصیلات افراد به تفکیک گروه‌های شاهد و بیمار ۵۷
نمودار ۳-۶- درصد فراوانی بر اساس شغل افراد به تفکیک گروه‌های شاهد و بیمار ۵۹
نمودار ۳-۷-درصد فراوانی گروه بیماران از نظر فاکتور های خطر ۶۰

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱- ساختمان ویروس هپاتیت ۵

شکل۱-۱- اشکال متفاوت HBsAg ۵

شکل۱-۳- توزیع جغرافیایی ژنوتایپ‌های HBV در سطح جهان ۷

شکل۱-۴- ژنوم ویروس هپاتیت B ۸

شکل۱-۵- چرخه زندگی ویروس هپاتیت B ۱۱

شکل۱-۶- الگوی مارکرهای سرولوژیکی و مولکولی در عفونت هپاتیت B ۲۲

شکل۱-۷- مقایسه ساختار چهار گروه کموکاین‌ها ۲۶

شکل۱-۸- ساختار کموکاین رسپتورها ۲۹

شکل۱-۹- ساختار شماتیک از کموکاین رسپتور ۵ ..... ۳۱

شکل۱-۱۰- موقعیت قرارگیری جهش CCR5-Δ32 در ORF و پلی‌مرفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در پروموتر ژن *CCR5* ۳۲

شکل۳-۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *CCR5* روی ژل آگارز ۴۹

شکل۳-۲- الکتروفورز محصولات PCR اختصاصی آلل بر روی ژل آگارز. ۵۱

شکل پیوست الف- ۱- تکثیر DNA توسط PCR ۸۵

فصل اول

۱- مقدمه و کلیات

۱- ۱- مقدمه

۱-۱-۱- بیماری هپاتیت B

هپاتیت یک واژه کلی به معنی التهاب[1] کبد است و می‌تواند به وسیله‌ی انواعی از ویروس‌های هپاتیت (A-H) ایجاد شود. به هپاتیت B، هپاتیت سرمی[2] نیز گفته می‌شود (Robinson, 1990). طبق آمار سازمان جهانی بهداشت حدود ۲ میلیارد نفر در سراسر جهان آلوده به ویروس هپاتیت B شده‌اند و حدود ۲۴۰ میلیون نفر عفونت مزمن دارند، همچنین سالانه ۴ میلیون مورد بالینی حاد جدید روی می‌دهد و یک میلیون ناقل هر سال از هپاتیت فعال مزمن، سیروز یا سرطان کبدی اولیه می میرند (WHO, 2013). آنچه که این عفونت را به یکی از عفونت های مهم در مطالعات پزشکی و تحقیقی تبدیل نموده است، یکی شیوع بسیار بالای آن در دنیا و دیگری قابلیت ایجاد سیروز و سرطان کبدی در صورت تبدیل آن به عفونت مزمن است.

[1] Inflammation
[2] Serume Hepatitis

۱-۱-۲- تاریخچه هپاتیت B

منابع و اطلاعات اولیه نشان می‌دهند که یرقان[1] در بین یهودیان بابلی در پانصد سال قبل از میلاد مسیح شیوع داشته است. در طی این دوره‌ی اولیه بقراط، یرقان اپیدمیولوژیک را به عنوان چهارمین نوع یرقان شناسایی و معرفی کرد (Cockayne, 1912). با اینکه امروزه پزشکان می دانند که انواع ویروس‌های هپاتیت می‌توانند هپاتیت و در نتیجه یرقان ایجاد کنند، اما تنها ظرف ۵۰ سال گذشته است که بیشترین پیشرفت‌ها در زمینه شناخت انواع ویروس‌های هپاتیت صورت گرفته است. در سال ۱۸۸۵ لورمن برای نخستین بار ارتباط بین تلقیح تزریقی و بیماری کبدی را مطرح کرد. در آلمان گزارشاتی مبنی بر ایجاد یرقان در یک گروه متشکل از دویست نفر پس از واکسیناسیون علیه بیماری آبله که ویروس ضعیف شده آن منشاء لنف انسانی داشت ارائه گردید. در همین دوران که سرایت هپاتیت با سرنگ‌های چند بار مصرف گزارش شد، همچنین ارتباط واضحی بین تزریق خون یا فراورده‌های خونی و بیماری کبدی با دوره کمون طولانی در ایالت متحده و اروپا مشاهده گردید. به دنبال مشاهدات ناشی از تزریق واکسن تب زرد که در ساخت آن از سرم انسان استفاده می‌شد، این نتیجه حاصل گردید که باید از واکسن‌های فاقد سرم انسانی استفاده شود (Soffer, 1937). در سال ۱۹۳۸ Propert وجود یرقان را در بچه های دریافت کننده سرم افراد بهبود یافته از سرخک گزارش داد (Beeson, 1943, Propert, 1938) در سال ۱۹۶۳ Blumberg و همکارانش مطالعات وسیعی را بر روی HBV آغاز نمودند که منجر به دریافت جایزه نوبل پزشکی در سال ۱۹۷۶ شد. این دانشمند سرم فرد هموفیلی را که به دفعات متعدد خون دریافت کرده بود با سرم یک فرد بومی استرالیا مخلوط کرد و یک کمپلکس رسوبی آنتی‌ژن-آنتی‌بادی را کشف نمود. آنتی‌ژن عامل پدیده فوق بنام آنتی‌ژن استرالیا [2](AU) نامیده شد، که این آنتی‌ژن در سرم بیماران مبتلا به لوسمی، جذام و هپاتیت B یافت می‌شود (Ganem and Prince, 2004). چون این آنتی‌ژن در سطح هپاتیت B وجود دارد آن را

[1] Jaundice
[2] Australia

آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B [1](HBsAg) نامیدند. از سال ۱۹۶۹ غربالگری خون قبل از تزریق از حیث وجود HBsAg آغاز شد و امروزه این آزمایش به عنوان یک آزمایش ضروری به منظور پیشگیری از هپاتیت محسوب می‌شود (Ganem and Prince, 2004).

۱-۱-۳- ساختار ویروس‌شناسی مولکولی

۱-۱-۳-۱- طبقه‌بندی

ویروس هپاتیت B یک DNA ویروس از خانواده هپادناویروده[2] می باشد. این خانواده دارای دو جنس اورتوهپادناویروس[3] و آوی‌هپادناویروس[4] است که به ترتیب پستانداران و پرندگان را آلوده می کنند (Seeger *et al*., 2007, WHO, 2002). ویروس‌های این خانواده خصوصیات مشترکی از جمله اندازه و ساختمان ویریون، ترکیب آنتی‌ژنیک، اندازه و آرایش ژنتیکی DNA و مکانیسم همانندسازی مشابه و گرایش به سلول‌های کبدی دارند که آن‌ها را در یک خانواده قرار داده است. از مشخصات دیگر آن‌ها محدود بودن میزبانشان است، به طوری که HBV فقط انسان را به طور طبیعی آلوده می‌کند ولی عفونت‌های تجربی در دیگر پریمات‌های عالی مانند شامپانزه، بوزینه و میمون سبز آفریقایی نیز نشان داده شده است. HBV می‌تواند به غیر از سلول‌های کبدی، لنفوسیت‌ها و سلول‌های پانکراس را هم آلوده نماید. از این خانواده فقط HBV و ویروس موش خرمای کوهی[5](WHV) باعث هپاتیت مزمن فعال و هپاتوسلولار کارسینوما [6](HCC) می‌شوند و ویروس هپاتیت موش خرمای زمینی (GSHV)[7] هم تنها می‌تواند HCC ایجاد کند (Robinson, 1990, WHO, 2002).

[1] Hepatitis B Surface Antigen
[2] Hepadnaviridae
[3] Orthohepadnavirus
[4] Avihepadnavirus
[5] Wood chuck Hepatitis Virus
[6] Hepatocellular Carcinoma
[7] Ground Squirred Hepatitis Virus

۱-۱-۳-۲- ساختمان ویروس

در سال ۱۹۷۰ برای اولین بار Dane و همکارانش، HBV را یک ذره ۴۲ نانومتری دارای پوشش تعریف کردند که قطر قسمت مرکزی آن ۲۷ نانومتر است (ویریون کامل هپاتیت B).

ساختمان ویروس شامل اجزای زیر است:

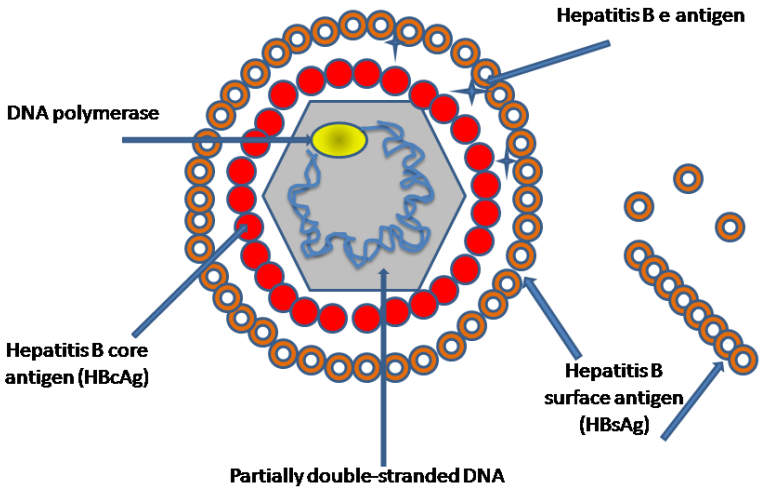
۱. پوشش خارجی ویروس که از سه نوع گلیکوپروتئین همراه با لیپیدهای سلولی تشکیل شده و همان HBsAg است و بر اساس تعداد اسیدآمینه موجود و وزن گلیکوپروتئین به انواع کوچک، متوسط و بزرگ نام‌گذاری می‌شود و به ترتیب توسط نواحی ژنی Pre-S_1 ، Pre-S_2 و ناحیه S از ژن S کد شده و توسط شبکه آندوپلاسمیک سلول میزبان ساخته می‌شود. ناحیه Pre-S_1، پلی‌پپتید آنتی‌ژن سطحی را کد کرده و می‌سازد که این آنتی‌ژن سبب شناخت عفونت ناشی از ویروس هپاتیت B در آزمایشگاه می‌گردد. محصول این قسمت باعث تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی خنثی‌کننده می‌شود.

۲. ناحیه داخلی که ۲۷ نانومتر بوده و از ۲۰۰ کپی یک فسفوپروتئین منفرد تشکیل شده است و به عنوان HBcAg[1] شناخته می‌شود.

۳. ژنوم حلقوی از جنس DNA که در قسمت‌هایی دو رشته‌ای و در برخی نواحی تک رشته‌ای می‌باشد. وزن تقریبی آن ۳/۲ kb بوده و از رشته کامل منفی و رشته ناکامل مثبت تشکیل شده است.

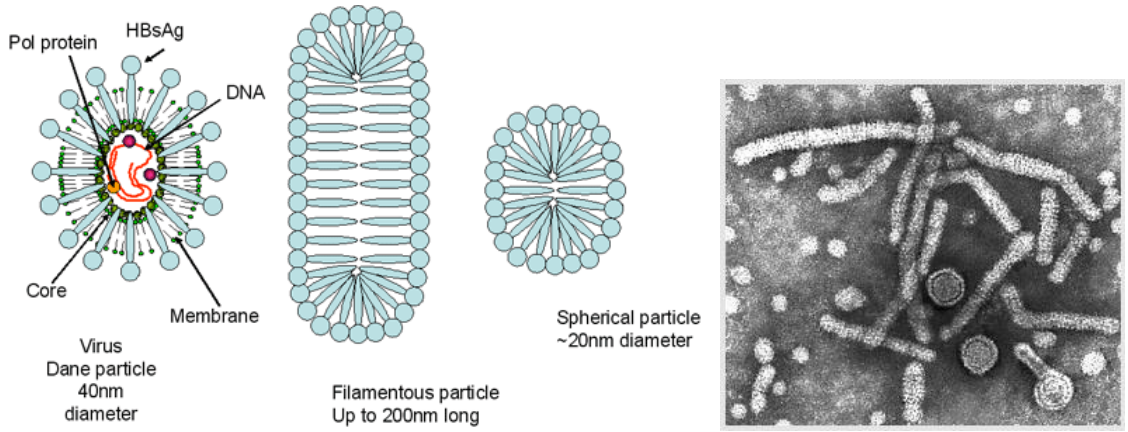
۴. پروتئین با چندین عمل آنزیمی از جمله رونویسی[2] که به انتهای ´۵ یک رشته DNA متصل شده و به عنوان DNA پلی‌مراز شناخته شده است. شکل۱-۱ ساختمان شماتیک HBV را نشان می‌دهد.

[1] Hepatitis B core Antigen
[2] Transcription



شکل۱-۲- ساختمان ویروس هپاتیت B (http://hepatitisbabout.org/hepatitis-b-virus)

بررسی فرا ساختار سرم بیماران HBV نشان می‌دهد که علاوه بر ذرات معمول ۴۲ نانومتری (که ذرات Dane نامیده می‌شوند) اشکال ذره‌ای دیگری نیز در سرم آنها وجود دارد که فراوان‌ترین آن‌ها کوچک، کروی و به قطر ۲۵-۱۷ نانومتر هستند، این غیرعفونی بوده و حاوی HBsAg و همچنین نوکلئوکپسید[1] ۲۷ نانومتری است. به غیر از این دو ذره، اشکال رشته‌ای (فیلامنتی) با طول‌های مختلف اما قطری مشابه با پارتیکل‌های کوچک وجود دارد که این ذرات نیز غیرعفونی بوده و حاوی یک فرم از HBsAg و فاقد اسیدنوکلئیک هستند(WHO, 2002) (شکل ۱-۲).



شکل۱-۳- اشکال متفاوت HBsAg. ذرات کوچک۲۲ نانومتری، ذرات رشته‌ای و ذرات ۴۲ نانومتری (ذرات Dane) (http://pathmicro.med.sc.edu , http://web.uct.ac.z)

[1]Nucleocapsid

۱-۱-۳-۳- آنتی‌ژن‌های HBV

۱. **HBsAg** : آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B که به عنوان اولین معرف عفونت حاد محسوب می‌شود و چنانچه این آنتی‌ژن بیش از ۶ ماه به طور ثابت حضور داشته باشد، معرف عفونت مزمن است (Merat *et al*., 2000, WHO, 2002).

۲. **HBcAg** : آنتی ژن Core ویروس هپاتیت B که DNA ویروسی را محصور می‌کند و در خون در گردش قابل شناسایی نیست. این آنتی‌ژن یکی از مارکرهای عفونت با ویروس است و دقیق‌ترین شاخص همانندسازی ویروس می‌باشد (WHO, 2002).

۳. **HBeAg**[1] : این آنتی‌ژن به درون ویریون الحاق نمی‌شود ولی به جای آن به درون سرم ترشح می‌شود و نشان‌دهنده درجه بالایی از عفونت HBV و تکثیر فعال ویروس می‌باشد (Merat *et al*., 2000). حضور این آنتی ژن در طول ۳-۶ هفته نشان دهنده عفونت حاد فعال است و این مرحله مسری‌ترین مرحله می‌باشد. حضور این مارکر ویرولوژیکی بیش از ۱۰ هفته نشان دهنده پیشروی به عفونت مزمن است. (WHO, 2002).

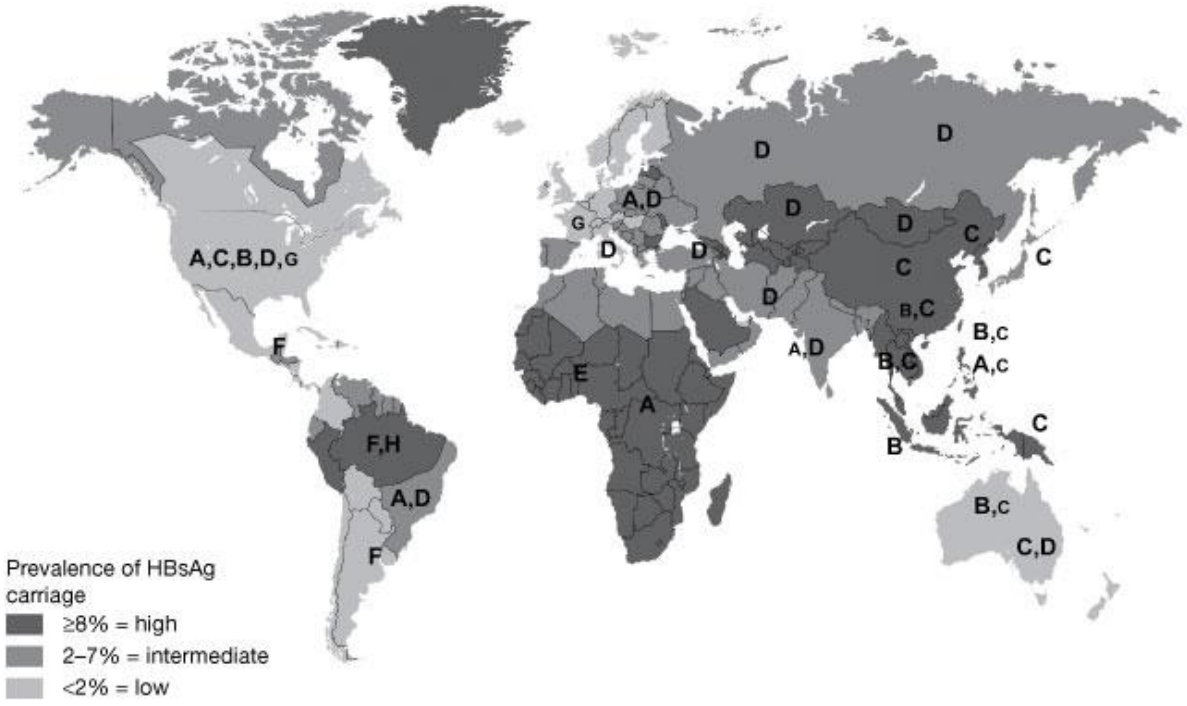
۴. **HBxAg**[2] : این آنتی‌ژن می‌تواند پروموتر ویروس و همچنین تعدادی از پروموترهای سلولی و ویروسی هترولوگ را فعال کند و همچنین فعال‌کننده رونویسی است. این پروتئین مستقیما به DNA متصل نمی‌شود و در خون بیماران حاد و مزمن حضور دارد (Will, 1991, WHO, 2002).

۱-۱-۳-۴- سویه‌ها و ژنوتایپ‌ها

هپاتیت B بر اساس اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک روی پروتئین‌های پوشینه[3] ویروس، دارای ۴ سروتایپ (adw, adr, ayr ,ayw) می‌باشد و بر اساس تفاوت در حداقل ۸ درصد کل توالی نوکلئوتیدی

[1] Hepatitis B e Antigen
[2] Hepatitis B x Antigen
[3] Envelope

و بیش از ۴٪ در ژن S به ۸ گروه ژنوتایپی (A-H) دسته‌بندی می‌شود (Ma *et al*., 2011, Huang *et al*., 2006). ژنوتایپ‌ها دارای توزیع جغرافیایی متمایزی هستند (شکل ۱-۳) و از آن‌ها در ردیابی تکامل و انتقال ویروس استفاده می‌شود. تفاوت در ژنوتایپ‌ها روی شدت بیماری اثر دارد (Ma *et al*., 2011).

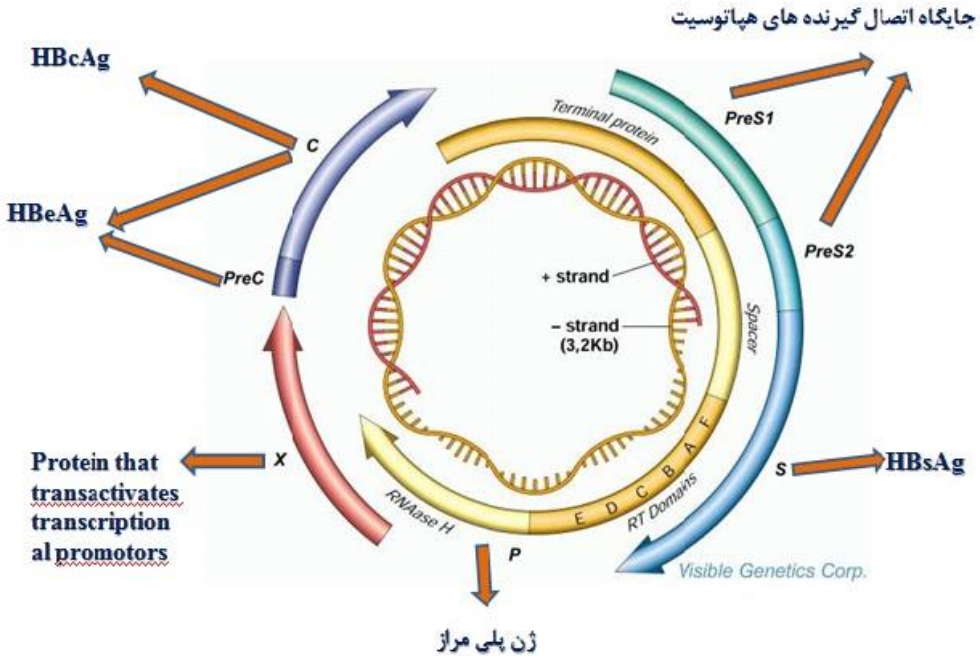


شکل۱-۴- توزیع جغرافیایی ژنوتایپ‌های HBV در سطح جهان (Liaw *et al*., 2010).

۱-۱-۳-۵- ژنوم ویروس

ژنوم ویروس هپاتیت B یک مولکول DNA حلقوی با طول تقریبی ۳۲۰۰ نوکلئوتید است که قسمتی از آن (نوکلئوتید۶۰۰ تا ۲۱۰۰) تک زنجیره‌ای می‌باشد (Soffer, 1937). زنجیره بلند DNA را زنجیره منفی یا L می‌نامند که به عنوان الگویی برای سنتز mRNA ویروسی عمل می‌کند و پروتئین به طور کووالانسی به انتهای ′۵ آن متصل شده است (Ganem *et al*., 1982) و زنجیره کوتاه را زنجیره مثبت یا S می‌گویند که دارای یک فاصله پرنشده‌ی الیگوریبونوکلئوتیدی در انتهای ′۵ خود

می‌باشد (Lien *et al*., 1986). ناحیه تک رشته‌ای یا شکاف، طول متغیر دارد و توسط پلی‌مراز تعمیر می‌شود و ژنوم دو رشته‌ای کامل را می‌سازد که به این عمل واکنش EPR[1] گفته می‌شود و طی آن انتهای رشته مثبت مثل پرایمر عمل کرده و از روی رشته منفی به عنوان الگو این رشته را ساخته و کامل می‌کند (Robinson and Greenman, 1974). انتهای ′۵ هر دو رشته به تکرارهای مستقیم کوتاه[2] (DRs) درDNA ویروسی ختم می‌شود، انتهای ′۵ رشته منفی DNA در درون نواحی تکراری که DR_1 نام دارد قرار دارد (Robinson, 1990). در حالی که انتهای ′۵ رشته مثبت در درون نواحی تکراری DR_2 قرار گرفته است (WHO, 2002). این تکرارها هر کدام در شروع سنتز رشته DNAی مربوط به خودشان دخالت می‌کنند. زنجیره L یا منفی چهار ORF[3] یا چهارچوب خواندن باز دارد که به هفت پروتئین شناخته شده ترجمه می‌شود. نواحی غیرکدکننده حضور ندارند و این ORFها شامل X، P، C و S هستند که با هم همپوشانی[4] دارند (WHO, 2002).



شکل۱-۵- ژنوم ویروس هپاتیت B (Medscape.com, Mar 2012)

[1] Endogenous Polymerase Reaction
[2] Direct Repeats
[3] Open Reading Frame
[4] Overlap