

Kronik Hepatit B hastalarında prekor/kor mutantlarının sıklığı

Frequency of precore/core mutants in chronic Hepatitis B cases

Sinem AKÇALI¹, Tamer ŞANLIDAĞ¹, Can BİÇMEN², Beril ÖZBAKKALOĞLU¹, Elçin AKDUMAN ALAŞEHİR³

¹Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

²Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

³Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

ÖZET

Amaç: Son yıllarda viral replikasyon kaybı olmaksızın anti-HBe serokonversiyonu gösteren bazı kronik hepatit B hastalarından izole edilen Hepatit B Virus (HBV) Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'lerinin incelenmesi ile prekor/kor geni üzerindeki mutasyonların varlığı ortaya konmuştur. Bu çalışmada kronik hepatit B hastalarından elde edilen serum örneklerinde prekor/kor mutasyonlarının sıklığı araştırılmıştır.

Yöntemler: Bu amaçla seroloji laboratuvarına gelen anti-HBe ve HBV DNA pozitif 69, HBeAg ve HBV DNA pozitif 31 toplam 100 serum örneğinde, INNO-LIPA yöntemiyle prekor/kor mutasyonunun varlığı araştırılmıştır. İstatistiksel analizlerde SPSS 11,5 kullanılarak ki-kare ve varyans analizi testleri yapılmıştır.

Bulgular: Altmışsekiz örnekte prekor bölgesinde, 57 örnekte ise kor promoter bölgesinde mutasyon saptanmıştır. HBeAg pozitif 31 örneğin 11'inde (%35), anti-HBe pozitif 69 örneğin ise 57'sinde (%83) prekor bölgesinde; yine HBeAg pozitif 31 örneğin 10'unda (%32), anti-HBe pozitif 69 örneğin ise 47'sinde (%68) kor promoter bölgesinde mutasyon tesbit edilmiştir. Hem prekor hem de kor promoter mutasyonları anti-HBe pozitif olan grupta belirgin olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Sonuç: Sonuç olarak, çalışma grubumuzda prekor/kor mutasyonlarına sık olarak rastlandığından, kronik hepatit B hastalarında tanı ve tedavinin planlanması aşamalarında bu mutasyonların varlığının araştırılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: HBeAg, Anti-HBe, HBV-DNA, prekor, kor, mutasyon

ABSTRACT

Objective: In recent years, the presence of precore/core region mutations were uncovered by the examination of Hepatitis B Virus (HBV) deoxyribonucleic acid (DNA) that is isolated from patient samples with anti-HBe seroconversion without viral replication loss. In this study, the frequency of precore/core mutations were investigated on serum samples obtained from chronic hepatitis B patients.

Methods: From a total of 100 samples 69 anti-HBe and HBV DNA positive, and 31 HBeAg and HBV DNA positive samples were analyzed in the study to determine the mutations with the INNO-LIPA method at the Serology laboratory. Statistical analyses were done with, SPSS v11.5 and chi-square and variance analysis (ANOVA) tests were conducted.

Results: The precore mutations were detected in 68, while the core promoter mutations were present in 57 samples. Mutations were detected at the precore region in 11 out of 31 HBeAg positive (35%), and 57 out of 69 anti-HBe positive samples (83%). Likewise, the core promoter region was affected in 10 of 31 HBeAg (32%), and 47 out of 69 anti-HBe positive samples (68%). Both precore and core promoter mutations were substantially higher in the anti-HBe positive group ($p<0.05$).

Conclusion: As a result, since precore/core mutations were prevalent in samples obtained from the study group, it is our opinion that careful attention must be paid to such mutations during the diagnosis and treatment phases of chronic hepatitis B patients.

Key words: HBeAg, Anti-HBe, HBV-DNA, precore, core, mutation

Alındığı tarih: 06.02.2013

Kabul tarihi: 23.03.2013

Yazışma adresi: Doç. Dr. Sinem Akçali, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa
e-mail: sinemakcali@yahoo.com

GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV), dünyada 350 milyonu aşkın kişiyi enfekte etmesi, karaciğer sirozu ve karaciğer kanserine yol açabilmesi nedeniyle çok ciddi bir sağlık sorunudur. HBV'nin hangi mekanizmayla karaciğerde hasar yaptığı bilinmemektedir. Virusun sitopatik olmadığı, enfekte hepatositlere karşı gelişen immün yanıtın karaciğer hasarından sorumlu olduğu sanılmaktadır. Bu durumda konağın immün yanıtının etkinliği yanı sıra virusun antijenik yapısındaki, anti-jen ekspresyonu ve replikasyon kapasitesindeki değişiklikler de karaciğerde oluşan patolojide farklılıklara neden olabilir ⁽¹⁾. Virusa ait bu faktörler virusun genetik yapısındaki değişikliklerle yakından ilişkilidir. Bu nedenle HBV enfeksiyonlarının akut kendi kendini sınırlayan hepatitten, asemptomatik taşıyıcılık, fulminan hepatit, kronik hepatit ve karaciğer kanserine kadar değişen farklı klinik görünümünden virusun genomik değişikliklerinin sorumlu olup olmadığı hep merak edilmiştir. Moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesi virusun genomundaki değişikliklerin daha kolay ve daha geniş incelenmesine olanak sağlamıştır. Son on yılda HBV genetik değişiklikleri ve bunların hastalığın kliniği ile ilişkileri çok sayıda araştırmanın konusu olmuştur.

Kısmen çift sarmallı bir DNA virusu olan HBV, yaşam siklusu sırasında pregenomik Ribo Nükleik Asit (RNA)'dan revers transkripsiyonla DNA'ya dönüşür. Her ne kadar hızlı replikasyon yeteneğine sahip bir virus olarak bilinse de; revers transkriptaz enziminin ilk okuma yeteneğindeki zayıflık nedeni ile, bu aşamada nükleotid yerleşiminde yanlışlıklar meydana gelmekte ve sonuçta genom yapısında moleküler düzeyde küçük mutasyonel değişimler ortaya çıkmaktadır. Klinik seyir, tedavi ve korunma açısından önemli sorunlar yaratan bu duruma tahmin edilenden daha sık rastlanmaktadır. Enfekte bireylerde her yıl HBV'nin tek bir lokusunda $1.4-3.2 \times 10^{-5}$ mutasyon olabileceği hesaplanmıştır. Aktif bağışık yanıt varlığına rağmen, virusta meydana gelen genetik değişiklikler mutant süşun hayatiyetini devam

ettirmesine olanak sağlamakta, bu durum tanıda karışıklıklara, aşı çalışmalarında ise başarısızlıklara yol açmaktadır. Bu nedenlerle HBV mutantlarının önemi her geçen gün biraz daha artmaktadır ⁽²⁾.

Son yıllarda viral replikasyon kaybı olmaksızın anti-HBe serokonversiyonu gösteren bazı hastalardan izole edilen HBV DNA' ların incelenmesi ile prekor/kor geni üzerindeki mutasyonların varlığı ortaya konmuştur. Prekor/kor bölgesi mutasyonları HBV'nin ilk tespit edilen ve üzerinde en çok durulan mutasyonlarıdır.

Kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyrinde HBeAg viral replikasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir. HBeAg'den anti HBe'ye serokonversiyon genellikle HBV replikasyonunun durması ve klinik remisyon ile eşzamanlıdır. Hâlbuki, bazı HBeAg negatif hastalarda viremi ve aktif karaciğer hastalığı devam etmektedir. Bu hastaların birçoğu HBeAg üretiminin azalması ya da durmasına neden olan çeşitli HBV formları ile enfekte olmuşlardır. İnfeksiyöz virion üretiminin devam etmesine rağmen, HBeAg sentezinin olmadığı prekor bölge mutasyonları tanımlanmıştır ⁽³⁾. Bunlardan en sık karşılaşılanı prekor bölgesinde prematür stop kodon oluşumuna neden olan 1896. nükleotitte görülen Guanin (G)-Adenin (A) değişikliğidir (A1896G) ^(4,5). Yapılan çalışmalarda prekor mutantlarının HBeAg pozitif kronik HBV enfeksiyonlarında da görülebileceği gösterilmiştir ⁽⁶⁾. Ancak bu grupta prekor mutasyonlarının önemi net değildir.

HBeAg negatif ve pozitif kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda kor promoter bölgesinde başka mutasyonlar da tanımlanmış olup, bu mutasyonlar promoter messengerRNA (mRNA) transkripsiyonunu azaltıcı yönde regüle ederek HBeAg ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır ⁽⁷⁻⁹⁾. Kor promoter mutasyonları çoğunlukla 1762. nükleotitte A-Timin (T) (A1762T) ve 1764. nükleotitte G-A (G1764A) değişikliği şeklindedir.

Bu çalışmada bölgemizdeki kronik hepatit B hastalarından elde edilen serum örneklerinde prekor/kor mutasyonlarının yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Serum örnekleri: Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Seroloji laboratuvarına gelen HBsAg ve HBV DNA pozitif 100 örnek geriye dönük olarak taranarak çalışmaya alındı.

Serolojik inceleme: Örnekler HBeAg ve anti-HBe açısından makroeliza yöntemiyle (AXYM, Abbott) test edildi.

Total serum DNA izolasyonu: Total DNA 200 μ l serum örneğinden NucleoSpin DNA isolation kit (Biogene, Kimbolton, UK) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda ekstrakte edildi.

Real-time PCR: Hastaların viral yük düzeyleri 7700 DNA sequencer [Perkin-Elmer (Applied Biosystems, Inc.)] kullanılarak floresan real-time Polimerase Chain Reaction (PCR) yöntemiyle araştırıldı.

Prekor/kor mutasyonlarının araştırılması: Serum örnekleri prekor/kor mutasyonları varlığı açısından INNO-LiPA HBV prekor (Research prototype kit; Innogenetics NV, Ghent, Belgium) kiti ile araştırıldı. INNO-LiPA HBV prekor revers hibridizasyon temelli bir testtir. INNO-LiPA HBV prekor stipleri bir adet kahverengi marker çizgisi, 2 adet kontrol çizgisi ve 7 adet paralel prob çizgisi içerir. 200 μ l serum örneğinden izole edilen DNA örnekleri 10 μ l steril distile su ile dilüe edildi ve nested PCR ile amplifiye edildi. Basal kor promoter ve prekor bölgesinden çoğaltılan biotinlenmiş DNA materyali, membran-temelli strip-lere paralel çizgiler şeklinde immobilize edilmiş spesifik oligonükleotid proplarla hibridize edildi⁽³⁾. Hibridizasyonun ardından, hibridize olmamış DNA yıkamayla uzaklaştırıldı, alkalın fosfatazla işaretlenmiş streptavidin eklendi ve bu strip üzerindeki hibridize olmuş olan biotinli örneklerle bağlandı. Ardından kromojen eklenip inkübe edildi ve pozitif sonuçlar mor/kahverengi çizgiler şeklinde gözlemlendi.

İstatistiksel analizler

SPSS 11,5 kullanılarak ki-kare ve varyans analizi testleri yapıldı.

BULGULAR

Yüz örneğin 68'inde (%68) prekor bölgesinde, 57'sinde (%57) kor promoter bölgesinde mutasyon saptandı.

Prekor mutantları

Prekor bölgesinde 31 (%31) örnekte 1896. nükleotitte mutasyon saptanmadı (wild-type). Otuz altı (%36) örnek G1896A mutasyonuna, 32 (%32) örnek de wild-type ve variant sekansların her ikisinin de saptandığı mix tip mutasyona sahipti (Tablo 1). Prekor variantlar antiHBe pozitif örneklerde (%83), HBeAg pozitif örneklere göre (%35) daha sık olarak tespit edildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Anti-HBe ve HBeAg pozitif örneklerde tek başına 1896 mutasyonu sırasıyla %51 ve %3, mix tip mutasyon %32 ve %32, wild-type sekans ise %16 ve %65 olarak saptandı. Anti-HBe pozitif bir örnek ise "tiplendirilemeyen" olarak belirlendi.

Tablo 1. INNO-LiPA prekor ile prekor ve kor mutantlarının sıklığı.

Bölge ve variant	Test edilen örnek sayısı		
	HBeAg (+)	Anti-HBe (+)	Total
PC (nt 1896)			
WT (G)	20	11	31
Variant (A)	1	35	36
WT+ Variant (G+A)	10	22	32
Untypeable	-	1	1
TOTAL	31	69	10
CP (nt1762 ve nt 1764)			
WT (AG)	21	16	37
Dual variant (TA)	2	28	30
Single variant (AT)	-	2	2
Single variant (AA)	2	10	12
Mixed (AG+TA)	2	4	6
Mixed (AG+AA)	-	2	2
Mixed (AG+AT)	3	-	3
Mixed (WT+AA+TA)	-	1	1
Mixed (WT+AA+AT)	1	-	1
Indeterminate	-	2	2
Untypeable	-	4	4
TOTAL	31	69	100

Kor mutantları

Kor bölgesinde, INNO-LiPA HBV prekor testiyle

37 örnekte (%37) wild-type sekans (A1762/G1764), 30 örnekte (%30) klasik dual mutasyon (A1762T, G1764A), 2 örnekte (%2) 1764T tekli mutasyonu, 12 örnekte (%10) 1764A tekli mutasyonu, 6 örnekte (%6) wild-type ve klasik dual mutasyonun birlikteliği, 2 örnekte (%2) wild-type ve 1764A tekli mutasyonu birlikteliği, 3 örnekte (%3) wild-type ve 1764T tekli mutasyonu birlikteliği, 1 örnekte (%1) wild-type, 1764A ve klasik dual mutasyonun birlikteliği, 1 örnekte (%1) wild-type, 1764A ve 1764T tekli mutasyonu birlikteliği, 2 örnekte (%2) belirsiz sonuç saptandı. Anti-HBe pozitif 4 örnek "tiplendirilemeyen" olarak belirlendi.

Klasik dual mutasyon HBeAg pozitiflerde %6, anti-HBe pozitiflerde %41 oranlarında saptanırken, kor mutantlarının anti-HBe pozitif örneklerde sıklığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

HBV DNA düzeyleri

HBV DNA düzeyleri prekor ve kor promoter bölgelerinin her ikisinde de mutasyon bulunan hastalarda, tek başına prekor ya da kor mutasyonu olan ve hiçbir mutasyon saptanmayan hastalara oranla istatistiksel olarak belirgin olarak düşük tespit edildi ($p<0,05$).

TARTIŞMA

HBV'nin ilk belirlenen ve üzerinde en çok durulan mutasyonları prekor/kor bölgesinde yerleşen mutasyonlardır. Prekor bölgesinde görülen en önemli mutasyon HBeAg'nin üretilememesi ile karakterize olan stop kodon oluşumudur. Prekor stop kodon mutasyonu ilk başlarda ağır karaciğer hastalığı olanlarda ve fulminan hepatitli hastalarda tespit edilmiştir⁽⁴⁾. Ancak, bunun ardından yapılan geniş araştırmalarda stop kodon mutantının asemptomatik taşıyıcılarda da tespit edildiği gösterilmiştir⁽⁵⁾. HBeAg hepatositlerin yüzeyinde sitotoksik T hücrelerinin yanıt geliştirdiği en önemli antijenik yapılardan biridir ve bu antijenin yokluğu virusun immün sistemden kaçmasına ve infeksiyonun devamlılığına neden olmaktadır

⁽⁶⁾. Bugün için henüz hastalığın kliniği ile HBeAg (-) mutantların ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Olasılıkla HBeAg'nin immün hedef antijen olma özelliği ile immün tolerojen olma özelliği arasındaki denge hastalığın aktivitesini belirlemektedir.

Prekor stop kodon mutasyonlarına Akdeniz çevresi ülkelerde ve Uzakdoğuda daha fazla rastlanmaktadır. Bunun nedeni HBV genotiplerinin farklı coğrafi dağılımıdır. Prekor stop kodon mutasyonu ancak virus genomunun 1858. nükleotidinde T bulunan genotiplerde (genotip C ve D) meydana gelebilmektedir. Hâlbuki aynı numaralı nükleotidde sitozin (C) bulunduran genotip A'da C1858T mutasyonu olmadıkça hiçbir zaman stop kodon mutasyonu meydana gelmemektedir^(10,11). Bu moleküler yapısal özellik nedeniyle stop kodon mutantları dünyanın bazı bölgelerinde daha sık görülmektedir.

Bu araştırmada çalışma grubunun %68'inde prekor mutasyonları, %57'sinde kor promoter mutasyonları belirlenmiştir.

HBeAg pozitif örneklerin %35'inde prekor bölgesinde, %32'sinde kor promoter bölgesinde mutasyon saptanırken, anti-HBe pozitif örneklerin %83'ünde prekor bölgesinde, %68'inde ise kor promoter bölgesinde mutasyon saptanmıştır. HBeAg pozitif grupta %35 olan prekor mutasyon sıklığının, anti HBe pozitif grupta %83'e ulaşması, bu mutasyonun antiHBe serokonversiyonununun ve karaciğer hastalığının aktivitesinin devam etmesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Ülkemizde bu konu ile yapılan çalışmalar sayıca oldukça az olup, Bozdayı ve ark.⁽¹²⁾ HBe pozitif hastalarda %15, anti-HBe pozitif hastalarda %85 oranında prekor stop mutasyonu varlığını bildirmiştir. Yine Özgenç ve ark.⁽¹³⁾ 44 kronik HBV hastasında prekor mutasyonlarını HBe pozitif grupta %55, anti-HBe pozitif grupta %46 olarak tespit etmiştir. Arslan ve ark.⁽¹⁴⁾ ise anti-HBe pozitif 51 hastanın hiçbirinde prekor ve kor promoter bölgesinde mutasyon saptamamıştır.

Ülkemiz dışında dünyada yapılan diğer çalışma sonuçlarına baktığımızda Tunus'tan Aayed ve ark.'nın

⁽¹⁵⁾ çalışmasında, HBeAg pozitif örneklerde prekor mutasyonlarının oranı %88, anti HBe pozitif örneklerde %94 iken, kor promoter mutasyonları aynı sırayla %18 ve %65 olarak bildirilmiştir. Pakistan'daki bir diğer çalışma sonucuna göre prekor mutasyonları HBeAg pozitif örneklerde %18, anti HBe pozitif örneklerde %31 iken, kor promoter mutasyonlarında bu oran aynı sırayla %21 ve %52 olarak tespit edilmiştir ⁽¹⁶⁾. Meksika'da yapılan başka bir çalışmada, olguların HBeAg, anti HBe ve HBV DNA düzeylerine bakılmaksızın HBsAg ve HBV DNA pozitif örneklerin %12'sinde prekor, %2'sinde de kor promoter mutasyonları saptanmıştır ⁽¹⁷⁾. Oranlar arasındaki bu farklılıklar yalnızca araştırmaların yapıldığı bölgelerden kaynaklanan farklılıklardan değil, aynı ülkede birden fazla genotipin görülebilmesi ve bu farklı izolatlarla çalışmaların yürütülmüş olmasına da bağlanmaktadır ⁽¹⁵⁾. Örneğin, genotip A ve D'nin baskın olarak görüldüğü İspanya'da HBeAg negatif olgularda prekor mutantların sıklığı %65.3 iken, genotip B ve C'nin yaygın olduğu Çin'de A1896 mutantlarının oranı daha yüksektir ^(18,19).

Diğer taraftan İsrail'den Tur-Kaspa'nın ⁽²⁰⁾, ülkemizden Bozdayı'nın ⁽¹²⁾ ve Japonya'dan Okamoto'nun ⁽²¹⁾ çalışmalarında HBeAg negatif olgularda yalnızca prekor mutantları saptanırken, Yunanistan'dan Carman'ın ⁽⁵⁾, Kore'den Ayed'in ⁽¹⁵⁾ araştırmalarında ise olguların çoğunda mutant ve mikst viral suşların birlikte bulunduğu bildirilmektedir. Bizim araştırmamızda da HBeAg negatif, anti HBe pozitif grupta prekor mutantları olguların %50'sinde saptanırken, %32'sinde mikst tip (mutant+wild type) belirlenmiştir.

Yine araştırmamızda mutant suşlarla enfekte hastaların viral yük düzeyleri mutant olmayanlarla enfekte olanlara göre daha düşük olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuç özellikle prekor mutasyonlarının düşük düzey HBV DNA düzeyleri ile birlikte olduğunu destekleyen başka araştırmalarda da vurgulanmaktadır ^(22,23).

Mutantların hastalığın tedavi yanıtıyla ilişkisi çeşitli araştırmalarda araştırılmış ve ilk alınan sonuçlar mutantların interferona yanıtının daha kötü oldu-

ğu yönünde olmuştur ⁽⁶⁾. Ancak daha sonraki çalışmalarda, tedavi sonu yanıt açısından mutantlarla wild tip infeksiyonları arasında fark olmadığı savunulmaktadır. Fakat mutant virus infeksiyonlarında nüks oranı çok daha yüksek bulunmaktadır. Bunlara karşın özellikle Uzakdoğuda mutant virus enfeksiyonlarında kalıcı yanıt oranının yüksek olduğuna dair yayınlar vardır. Bu yayınlarda mutant virusla olan infeksiyonlarda tedavi sonu yanıtın wild tip ile olan infeksiyonlardan çok daha iyi olduğu vurgulanmaktadır ⁽²⁴⁾. Aslında mutantların farklı genotiplerde farklı oranlarda bulunması, yapılan araştırmaların çoğunda bu hasta gruplarının genotip ilişkili olarak değerlendirilmesine yol açmıştır. Tedavi uygulanan hastalarda mutasyonların yanı sıra konağın immün durumu, karaciğer hasarının derecesi gibi diğer pek çok faktörün de tedavi yanıtını etkilediğinin dikkate alınması ve birlikte değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir ⁽²⁵⁾.

Prekor stop kodon mutantlarıyla enfekte sirozlu hastalarda karaciğer transplantasyonu sonrası hepatit B rekürrensini ve buna bağlı graft kaybı wild tip enfekte olanlara göre daha fazla görüldüğü bildirilmiştir ⁽²⁶⁾. Ayrıca yine kronik hepatit B infeksiyonlarında bazen karşımıza çıkan ekstrahepatik belirtiler ile prekor mutantları arasında ilişki olduğu da gösterilmiştir ⁽²⁷⁾.

Günümüzde kronik hepatit B tedavisinde nükleozid analoglarının, özellikle lamivudinün yoğun olarak kullanılması nedeniyle mutant virusla enfekte hastaların lamivudin tedavisine yanıtlarının farklı olup olmadığı da araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada lamivudin ile tedavi edilen 60 HBeAg(-) hastanın %63'ünde 24 haftada tam cevap elde edildiği ve bir yılda hastaların %60'ında Knodell skoruna göre en az 2 puan histolojik iyileşme sağlandığı bildirilmiştir ⁽²⁸⁾.

Sonuç olarak, çalışma grubumuzda prekor/kor mutasyonlarına sık olarak rastlanmıştır. Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmaların sayıca az olduğu düşünüldüğünde kronik hepatit B hastalarında tanı ve tedavinin planlanması-izlenmesi aşamalarında bu mutasyonların varlığının araştırılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Stuyver L, De Gendt S, Cadranel JF, Van Geyt C, Van Reybroeck G, Dorent R, et al. Three cases of severe subfulminant hepatitis in heart-transplanted patients after nosocomial transmission of a mutant hepatitis B virus. *Hepatology* 1999;29:1876-83.
<http://dx.doi.org/10.1002/hep.510290614>
PMid:10347133
2. Kıyan M. Hepatit B virusu. S: 86-120. Kılıçturgay K, Badur S (editörler). *Viral Hepatit* 2001. 2000, 1. baskı. Deniz Ofset, İstanbul.
3. Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biological properties of hepatitis B virus genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997;233:374-81.
<http://dx.doi.org/10.1006/viro.1997.8594>
PMid:9217060
4. Brunetto MR, Giarin MM, Oliveri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfarano A, et al. Wild-type and e-antigen minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4186-90.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.10.4186>
PMid:2034663 PMCid:PMC51623
5. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, et al. Mutation preventing formation of hepatitis Be antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989;9:588-91.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)90713-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(89)90713-7)
6. Brunetto MR, Giarin M, Saracco G, Oliveri F, Calvo P, Capra G, et al. Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1993;105:845-50.
PMid:7689519
7. Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996;70:5845-51.
PMid:8709203 PMCid:PMC190601
8. Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevilla-Pico C, et al. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the united States. *Hepatology* 2003;38:619-28.
<http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2003.50352>
PMid:12939588
9. Chan HL, Hussain M, Lok AS. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in core promoter and precore regions during Be antigen seroconversion. *Hepatology* 1999;29:976-84.
<http://dx.doi.org/10.1002/hep.510290352>
PMid:10051506
10. Li JS, Tong SP, Wen YM, Vitvitski L, Zhang Q, Trépo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* 1993;67:5402-10.
PMid:8350403 PMCid:PMC237941
11. Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, et al. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995;22:1641-7.
<http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840220605>
PMid:7489968
12. Bozdayı AM, Bozkaya H, Turkyılmaz A, Aslan N, Verdi H, Kence A, et al. Polymorphism of precore region of hepatitis B virus DNA among patients with chronic HBV infection in Turkey. *Infection* 1999;27:357-60.
<http://dx.doi.org/10.1007/s150100050043>
PMid:10624597
13. Ozgenc O, Ozacar T, Erensoy S, İnan N, Ari A, Kuruuzum Z, et al. Clinical significance of basal core promoter and precore mutations in chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2007;54:2319-23.
PMid:18265656
14. Arslan U, Tuncer İ, Fındık D, Ural O. HBeAg negatif, anti-HBe pozitif kronik hepatit B olgularında prekor/kor bölge mutasyonlarının ve genotip dağılımlarının değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2008;22:123-129.
15. Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Aouadi H, Sfar I, Najjar T, et al. Hepatitis B virus genotypes and precore/core-promoter mutations in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Infect* 2007;54:291-7.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2006.05.013>
PMid:16911832
16. Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SA, Rizvi SA. Genetic variability in the precore and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi. *BMC Gastroenterol* 2006;24(6):20-6.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-230X-6-20>
PMid:16863587 PMCid:PMC1544342
17. Alvarado-Esquivel C, Sablon E, Conde-González CJ, Juárez-Figueroa L, Ruiz-Maya L, Aguilar-Benavides S. Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: predominant circulation of hepatitis B virus genotype H. *World J Gastroenterol* 2006;12:6540-5.
PMid:17072988
18. Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Valdes A, Allende H, et al. Mutations in the basic core promoter region of hepatitis B virus. Relationship with precore variants and HBV genotypes in a Spanish population of HBV carriers. *J Hepatol* 2004;40:507-14.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2003.11.015>
PMid:15123367
19. Honda A, Yokosuka O, Ehata T, Tagawa M, Imazeki F, Saisho H. Detection of mutations in the enhancer 2/core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection: Comparison with mutations in precore and core regions in relation to clinical status. *J Med Virol* 1999;57:337-44.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199904\)57:4<337::AID-JMV2>3.0.CO;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199904)57:4<337::AID-JMV2>3.0.CO;2-L)
20. Tur-Kaspa R, Klein A, Aharonson S. Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of liver disease severity. *Hepatology* 1992;16:1338-42.
<http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840160606>
PMid:1446889
21. Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, et al. Hepatitis B viruses with precore region defects prevails in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 1990;64:1298-1303.
PMid:2304145 PMCid:PMC249247
22. Kurosaki M, Enomoto N, Asahina Y, Sakuma I, Ikeda T, Tozuka S, et al. Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1996;49:115-23.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199606\)49:2<115::AID-JMV8>3.0.CO;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199606)49:2<115::AID-JMV8>3.0.CO;2-8)

23. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999;179:775-82. <http://dx.doi.org/10.1086/314688> PMID:10068571
24. Aikawa T, Kanai K, Kako M, Kawasaki T, Hino K, Iwabuchi S, et al. Interferon-alpha 2a for chronic hepatitis B with e antigen or antibody:comparable antiviral effects on wild-type virus and precore mutant. *J Viral Hepat* 1995;2:243-50. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2893.1995.tb00036.x> PMID:8745316
25. Aygen B. Kronik B hepatitinde tedavi yanıtını etkileyen faktörler, s:34-36. Klinik XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongre kitabında, 2005.
26. Angus PW, Locarnini SA, McCaughan GW, Jones RM, McMillan JS, Bowden DS. Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation. *Hepatology* 1995;21:14-8. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840210104> PMID:7806147
27. Lohr H, Goergen B, Weber W, Godderz W, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Mixed cryoglobulinemia type II in chronic hepatitis B associated with HBe-minus HBV mutant: cellular immune reactions and response to interferon treatment. *J Med Virol* 1994;44:330-5. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.1890440404> PMID:7897364
28. Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, et al. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology* 1999;29:889-96. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510290321> PMID:10051494