مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان 1390، دوره سوم، شماره یازدهم، صفحه28-23

بررسی حضور HBV DNA در بیماران HBeAb مثبت

سعاد غابشی [1]، زهره شریفی [2]، سید مسعودحسینی [1]، محمود محمودیان شوشتری [2]

1. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران
2. مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران

نویسنده مسؤول: دکتر زهره شریفی. سازمان انتقال خون ایران، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات انتقال خون.
sharifiz@yahoo.com

دریافت: 90/10/14 پذیرش: 90/12/5

چکیده

زمینه و هدف: عفونت هپاتیت B یکی از شایعترین بیماری های عفونی در جهان است. حضور HBeAg با عفونت زایی بالای عفونت حاد HBV مرتبط است. حضور anti-HBe، سرکوب همانندسازی ویروسی و کاهش عفونت زایی بیماری را نشان می دهد. اما گاهی، ظهور anti-HBe به دنبال ناپدید شدن HBeAg در حضور HBV-DNA سرم، همانندسازی فعال ویروس را نشان می دهد. این حالت ممکن است به دلیل حضور موتاسیون های precore/core در ژنوم HBV باشد که بیان HBeAg را تغییر می دهد. هدف از این مطالعه شناسایی HBV-DNA و تیتر ویروس در بیماران HBeAb مثبت است.

روش بررسی: 50 نمونه سرمی بیماران مزمن آلوده به HBV مورد مطالعه قرار گرفت. مارکرهای سرولوژیکی هپاتیت B شامل HBsAg, HBeAg, HBeAb, HBcAb, به وسیله الایزا اندازه گیری شد. HBV-DNA از نمونه های سرم استخراج شد و سپس PCR بر روی HBV-DNA استخراج شده به کمک پرایمر اختصاصی ژن C انجام شد . تیتر ویروس HBV در سرم به وسیله Real-Time PCR تعیین شد. در این مطالعه هر دو روش PCR و Real-Time PCR انجام شد. سطوح آنزیم های کبدی AST و ALT در بیماران توسط کیت پارس آزمون و بر طبق دستورالعمل کیت اندازه گیری شد.

یافته ها: از 50 بیمار آلوده به HBV، همگی از نظر HBsAg و anti-HBc مثبت بودند و فقط 92% آنها HBeAb مثبت بودند. HBV-DNA در همه بیماران شناسایی شد. از بیماران HBeAb مثبت، 36/7% آنها دارای تیتر ویروس بالای 10^5 Copy/ml بودند.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهد که طیفی از بیماران HBeAb مثبت، دارای تیتر ویروسی بالایی بودند. بنابراین ضروری است که احتمال حضور موتاسیون های precore /core در این بیماران مطالعه شود.

واژه‌های کلیدی: ویروس هپاتیت B، ؛ موتاسیون های کور و پره کور، ، تیتر ویروس، HBeAb

www.SID.ir

مقدمه

ویروس هپاتیت B از رایج ترین علل بیماری های کبدی مزمن مانند سرطان سلول کبدی می باشد. میزان ناقلان هپاتیت B در جهان 400 میلیون است که این میزان 5% کل جمعیت جهان است(1). در کشور ما حدود 3-2% جمعیت حامل ویروس هستند و در حدود 300 هزار نفر به بیماری مزمن کبدی، سیروز، کارسینوم هپاتوسلولار مبتلا هستند (2). شدت بیماریزایی عفونت HBV مزمن نامشخص است. هر دو فاکتورهای ویروسی و میزبانی ممکن است در آن نقش داشته باشند. ویروس هپاتیت B حداقل به 8 ژنوتیپ (A-H) طبقه بندی می شود که ممکن است در توزیع جغرافیایی، ویژگی های ویروسی و نتایج کلینیکی متفاوت باشند(3). نتیجه بیماری ناشی از عفونت HBV تا حدودی بستگی به نوع ژنوتیپ ویروس دارد(4). بطوریکه ژنوتیپ A در ارتباط با نتیجه بهتر بیماری و عمر طولانی تر فرد و ژنوتیپ B با پیشرفت سرطان کبد در بیمار ارتباط دارد و همچنین ژنوتیپ C منجر به بروز بیماری شدیدتری می شود(5). مطالعات در کشور ما حاکی از آن است که ژنوتیپ غالب در ایران ژنوتیپ D است. بیمارانی با این ژنوتیپ مراحل بیماری شدیدتر دارند و در مقایسه با افرادی با ژنوتیپ A و یا B کمتر به درمان اینترفرون پاسخ می دهند(6). واریانت های پره کور که در ژنوتیپ D متداول تر است در ناحیه مدیترانه بیشتر از بقیه جهان دیده می شود(7). شناسایی و ارزیابی کمی ویروس هپاتیت B در پلاسما یا سرم نقش مهمی در تشخیص و کنترل عفونت HBV و همچنین پاسخ به درمان ایفا می کند. از نظر کلینیکی، تیتر HBV-DNA از سطوح بالا در حدود 10^{10} Copy/ml در عفونت HBV مزمن تا سطوح خیلی کم در ناقلان مزمن HBeAg منفی و در بیمارانی که تحت درمان ضد ویروسی هستند و در آنهایی که عفونت HBV پنهان دارند، متغییر است. به علاوه سطوح مختلفی از HBV-DNA در بیمارانی که دچار تغییرپذیری زیادی در ژنوم HBV شده اند وجود دارد (۱،۴). ژنوم ویروس هپاتیت B حاوی چهار ژن می باشد که توالی آنها با هم همپوشانی دارد. ژن C شامل دو ناحیه پره کور (PC) حاوی 29 اسید آمینه و ناحیه کور حاوی 181 اسید آمینه می باشد و پروتئین های آن توسط دو کدون شروع ساخته می شوند(8و9). رونویسی از RNA پری ژنومی (Pregenomic RNA) جهت تکثیر ویروس هپاتیت B لازم است. همچنین رونویسی از پروتئین نوکلئوکپسید برای ترجمه و تولید پروتئین HBeAg که به جریان خون بیماران آزاد می شود ضروری است. HBeAg یک مارکر عفونت تکثیر ویروسی می باشد بنابراین به دنبال پاسخ ایمنی بدن و تغییر از حالت HBeAg به anti-HBe که نشانه کاهش تکثیر ویروس و در نتیجه کاهش سطح HBV-DNA در خون می باشد و با بهبودی بیماری کبدی همراه است (6). موتاسیون های HBV در مناطق BCP(Basal Core Promoter) و PC (Precore) مورد توجه ویژه ای قرار گرفته است. موتاسیون در ناحیه BCP ممکن است منجر به افزایش تکثیر HBV و و موتاسیون PC مانع ترجمه آنتی ژن e (HBeAg) می شود که وجود این پروتئین در خون نشانه ویروس کامل بوده و نشانه عفونت زائی بیمار است اما این ارتباط همیشه مطلق نیست چنان که در گروهی از بیماران با وجود Anti-HBe دارای تیتر بالای ویروس در خون بوده و به درمان دارویی مقاوم هستند و پیش آگهی مطلوبی ندارند (4و10). موتاسیون در مناطق پروموتر کور و پره کور از ژنوم HBV در بسیاری از بیماران مبتلا به عفونت مزمن که HBeAg منفی هستند گزارش شده است(11). تیتر HBV در بدن بیمار مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت B بستگی به عوامل مختلفی از قبیل: پاسخ ایمنی فرد، فاکتور های محیطی مانند مصرف الکل و فاکتور های ویروسی دارد(12). فاکتورهای ویروسی که قبل از درمان باید مورد توجه قرار گیرد شامل تیتر ویروس، موتاسیون در کدون متوقف کننده(13). ناحیه پره کور ویروس هپاتیت B و در ناحیه کور ویروس است که جهت ارزیابی فعالیت عفونت و مدیریت درمانهای ضد ویروسی در بیماران مبتلا به HBV کاربرد دارد. هدف از این مطالعه بررسی حضور HBV-DNA در بیماران HBeAb مثبت و تعیین تیتر ویروس در این بیماران است.

روش بررسی

بیماران مورد مطالعه: روش نمونه گیری بصورت تصادفی ساده می باشد. تعداد50 نمونه سرمی از بیماران مبتلا به هپاتیت B در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. کلیه افراد مورد مطالعه رضایت نامه مربوطه را تکمیل نمودند. فرم پرسشنامه بیماران شامل اطلاعاتی مانند جنس، سن، وضعیت تأهل، سابقه آلوده شدن با سرسوزن، سابقه خانوادگی هپاتیت و تزریق خون بود.

www.SID.ir
Archive of SID

تست الایزا: تعداد 50 نمونه سرمی از بیماران مبتلا به هپاتیتB در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. مارکرهای سرولوژیکی هپاتیت B شامل HBeAg, HBsAg, HBcAb, HBeAb به وسیله الایزا و توسط کیت Dia Pro Diagnostic Bioprobes انجام شد.

مارکرهای بیوشیمی: سطوح آنزیم های کبدی AST و ALT در بیماران اندازه گیری شد.

استخراج DNA از سرم: برای انجام این تست مولکولی کمی که مشخص کننده حضور HBV-DNA و مقدار آن است، ابتدا DNA ویروس از نمونه های سرم بیماران جدا گردید. بدین منظور از کیت مخصوص استخراج DNA ویروس هپاتیت B با نام تجاری QIAmp DNA mini-extraction Kit (Qiagen) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در نهایت 50 Ml از DNA استخراج شده و در انتهای لوله های اپندروف جمع گردید و به عنوان ذخیره در دمای 20^{oc}- نگهداری شد.

PCR کیفی: برای تعیین صحت کیت استخراج، 2 نمونه از DNA استخراج شده با استفاده از PCR کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت. این کیت حاوی یک مستر میکس شامل: Taq پلیمراز، لودینگ بافر، dNTP و پرایمرهای Forward و Revers به قرار زیر بود:

F: 5- GCATGGARACCACCGTGAAC-3
R: 5-CGATACAGAGCWGAGGCGGT-3

واکنش حرارتی اعمال شده به قرار زیر است: National denaturation در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 3 دقیقه یک بار تکرار، Denaturation در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، Annealing در دمای 60 درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه، Extention در دمای 72 درجه سانتی گرادبه مدت 1 دقیقه و Final extention در دمای 72 درجه سانتی گرادبه مدت 10 ثانیه، که از مرحله دوم Denaturationتا مرحله آخرFinal extention ، 42 بار این سیکل تکرار می شود.

Real-Time Polymerase Chain Reaction: پس از استخراج DNA، برای انجام Real-Time PCR از کیت تجاری مخصوص HBV با نام artus HBV LC PCR Kit (Qiagen) استفاده شد. ترکیب محلول ها، Taq پلی مراز، بافر و واکنش حرارتی اعمال شده کاملا منطبق با دستور شرکت سازنده کیت بود.

آنالیز آماری: یافته های آزمایشگاهی با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش 20 و به وسیله آزمون های کای دو و من ویتنی مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته ها

از بین این بیماران 68% مرد (34 نفر) و 32% زن (16 نفر) بودند (جدول1). میانگین سن بیماران 2/05 ±41/1 بودند. مارکرهای سرولوژیکی هپاتیت B شامل HBsAg, HBeAg, HBeAb, HBcAb به وسیله الایزا اندازه گیری شد که همگی از نظر HBsAg و anti-HBc مثبت بودند. 92% (46 نفر) از بیماران HBeAb مثبت و 8% (4 نفر) از آنها HBeAg مثبت بودند. آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ناحیه کور ویروسی انجام شد. حضور ژنوم ویروسی در تمام موارد مورد شناسایی قرار گرفت. میزان آنزیم های کبدی AST, ALT, ALK در بیماران تعیین گردید. میانگین ALK 858 ± 201/7، میانگین ALT 224 ± 93/2 و میانگین AST 166± 66/9 می باشد. تیتر ویروس HBV در سرم به وسیله Real-Time PCR تعیین شد. 36/7% از بیماران دارای تیتر ویروس بالای 10^5 Copy/ml و 53/3% دارای تیتر ویروس پایین تر از 20000 Copy/ml و 10% دارای تیتر ویروس بین 10^5-20000 Copy/ml بودند. میانگین تیتر ویروس در بیماران $3/7\times10^6\pm9/7\times10^5$ می باشد. اختلاف معناداری بین جنسیت بیماران و تیتر ویروس وجود ندارد (جدول 1). میانگین تیتر ویروس در بیماران HBeAb مثبت $9/3\times10^6\pm3/3\times10^6$ و در بیماران HBeAb منفی $2/7\times10^6\pm1/41\times10^6$می باشد که اختلاف معناداری بین مارکر سرولوژیکی HBeAb و تیتر ویروس وجود ندارد ($P<0.9$).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1. مقایسه بین میانگین (انحراف معیار) تیتر ویروس و متغییرها در بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن

متغییرها / تیتر ویروس	میانگین (انحراف معیار)	مقدار احتمال (P *Value)
سن (درصد) <41 (56) ≥41 (44)	5×10^7 (1×10^7) 2×10^7 (7×10^7)	0/06
جنسیت (درصد) مرد (68) زن (32)	3×10^7 (1×10^8) 3×10^7 (8×10^7)	0/95
بیماران (درصد) درمان شده (24) درمان نشده (76)	2×10^7 (6×10^7) 4×10^7 (1×10^8)	0/65

* آزمون آماری Chi- Square می باشد. $P<0.05$ معنی دار می باشد.

بحث

تعیین سطوح HBV-DNA به عنوان معیاری برای شناسایی مرحله بیماری، ریسک پیشرفت بیماری نسبت به سیروز و HCC (Hepato Cellular Carcinoma) شناسایی بیمارانی که نیاز به درمان ضدویروسی دارند، تعیین پاسخ به درمان و شناسایی بروز مقاومت های دارویی است. به طور کلی، سطوح HBV-DNA سرم بعد از بین رفتن HBeAg به طور چشمگیری کاهش می یابد. مطالعات متعدد نشان می دهند که آنتی ژن e هپاتیت B در بیماران، خطر پیشرفت بیماری و عفونت زایی را افزایش می دهد که در نهایت منجر به هپاتیت فعال، مزمن پیشرفته، سیروز کبد و سرطان سلول های کبدی HCC خواهد شد (18-14). حاملین مزمن بدون علامت با HBeAg منفی و با بار ویروس کمتر از 10^5 ژنوم بر میلی لیتر و آلانین ترانسفراز کبدی نرمال، در حالتی نسبتا پایدار قرار می گیرند که پیشرفت پاتولوژیکی و کلینیکی بیماری در آنها کمتر است(15). سطح HBV-DNA در رنج های متفاوتی در بین بیماران HBeAg منفی گزارش شده در مطالعه ای که توسط Huang و همکاران در سال 2006 صورت گرفت، 80% جمعیت مورد مطالعه دارای تیتر ویروس بالا و 20% آنها دارای تیتر ویروس پایین می باشند. در شمار زیادی از بیماران هپاتیت مزمن با HBeAg منفی ویروس به تکثیر ادامه می دهد (16). بر اساس نتایج مطالعه حاضر 92% از بیماران HBeAb مثبت بودند که HBV DNA در همه بیماران شناسایی شد. میانگین کپی در میلی لیتر سرم آنها با استفاده از روش Real Time PCR $3/7\times10^6$ بوده است. در مطالعه Cohi و همکاران در سال 2008 بر روی 30 بیمار انجام شد همگی در سرم خود حامل HBV DNA بودند و میانگین کپی در این مطالعه $3/73 \times 10^6$ در هر میلی لیتر از سرم بود (19). در مطالعه ای که توسط Liu و همکاران در سال 2005 انجام شد، حدود 37% از بیماران دارای تیتر ویروس بالای 10^5 Copies/ml بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیماران با تیتر ویروس کمتر از 10^5 Copies/ml و دارای موتاسیون در نواحی کور و پره کور افزایش 22 درصدی در پیشرفت بیماری نسبت به HCC در مقایسه با بیماران دارای تیپ وحشی ویروس بودند (20).جهش های پره کور در طی عفونت با تایپ وحشی و در طول تغییرات سرمی از HBeAg به anti-HBe در مرحله حذف توسط سیستم ایمنی (Immune Clearance) به وجود می آیند. این واریانت ها جهش هایی را در ناحیه پره کور که مانع تولید HBeAg می شود، با خود حمل می کنند، علی رغم اینکه تولید ویریون های عفونی را ادامه می دهند (21). با اینکه سطح DNA سرمی به عنوان معیار درمان بیماران CHB می باشد، ولی هنوز در مورد ارتباط بین سطح DNA ویروسی و آسیب کبدی بحث های فراوانی مطرح است. برخی مطالعات ارتباط بین مقدار DNA ویروسی و آسیب کبدی را در بیماران فاقد HBeAg تأیید کرده اند. برخی مطالعات گزارش کرده اند سطح پایین DNA ویروسی همیشه نشانه بهبود بیماری نیست و در برخی از بیماران شدت بیماری و پیشرفته شدن آن را رقم می زند (23و22،4). برخی از مطالعات ارتباط بین تیتر ویروس و سطوح آنزیم های کبدی را رد نموده و بر عکس گروهی دیگر از دانشمندان ارتباط ژنوتیپ و تیتر ویروسی و صدمه کبدی را گزارش کرده اند (24،20). در مطالعه حاضر هیچ اختلاف معناداری در تیتر ویروس با جنسیت، سن، و میزان آنزیم های کبدی وجود ندارد ($P>0.05$). اگر چه بین تیتر ویروس و وضعیت HBeAg اختلاف معنادار آماری به دست نیامد، اما در بیماران HBeAb مثبت تیتر ویروس نسبت به بیماران HBeAb منفی بیشتر است و این در حالیست که انتظار می رود بیماران با این مشخصه سرولوژیکی تیتر ویروس پایین تری نسبت به بیماران HBeAb منفی

Archive of SID
www.SID.ir

داشته باشند. با توجه به اینکه در ایران حدود 58% عفونت های ویروسی HBV همراه با موتاسیون در ناحیه precore می باشد و ممکن است علی رغم همانندسازی فعال ویروسی، anti-HBe نیز مشاهده گردد (24). بنابراین عدم وجود HBeAg و یا حضور anti-HBe هرگز نباید بدین معنا تلقی شود که عفونت در فاز غیرهمانندسازی قرار دارد و سنجش HBV-DNA و سایر تست های سرولوژیکی نیز ضروری به نظر می رسد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می دهد که طیفی از بیماران HBeAb مثبت، دارای تیتر ویروسی بالایی بودند. بنابراین ضروری است که احتمال حضور موتاسیون های precore /core در این بیماران مطالعه شود.

تشکرو قدردانی

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و دانشگاه شهید بهشتی انجام گردیده است. بدینوسیله از زحمات مسئولین محترم این سازمان و دانشگاه شهید بهشتی که در این تحقیق همکاری لازم را با دانشجو داشته اند، تشکر و قدردانی می شود.

References

1- Aakanksha, Asim M, Sharma P.K, Das BC, Kar P. *Analysis of Carriers of Hepatitis B Virus from a Tertiary Referral Hospital: Does the Viral Load Change During the Natural Course of Infection?* Medical Virology. 2011; 83: 1151-1158.
2- Jalali M, Alavian SM. *Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B*. J Hepatitis Monthly. 2006; 6 (1): 31-35.
3- Xu Z, Ren X, Liu Y, Li X, Bai S, Zhong Y, et al. *Association of hepatitis B virus mutations in basal core promoter and precore regions with severity of liver disease: an investigation of 793 Chinese patients with mild and severe chronic hepatitis B and acute-on-chronic liver failure*. J Gastroenterol. 2011; 46: 391-400.
4- Ren X, Xu Z, Liu Y, Li X, Bai S, Ding N, et al. *Hepatitis B virus genotype and basal core promoter/ precore mutations are associated with hepatitis B-related acute- on- chronic liver failure without pre-existing liver cirrhosis*. J Viral Hepatitis. 2010; 17: 887-895.
5- Chan LH. *Significance of hepatitis B virus genotypes and mutations in the development of hepatocellular carcinoma in Asia*. J Gastroenterology &Hepatology. In press 2010.
6- Milani S, Sharifi Z, Hosseini M, Mahmoodian Shooshtari M. *Determination of HBV Genotypes among Hbs Ag Positive Blood Donors in Tehran, Iran Using PCR-RFLP*. Iranian J Publ Health. 2009; 38: 41-47.
7- Postchi H, Mohamadkhani A, Bowden S, Montazeri G, Ayres A, Revill P, et al. *Clinical significance of precore and core promoter mutations in genotype D hepatitis B-related chronic liver disease*. J Viral Hepatitis. 2008; 15: 753-760.
8- Biswas A, Chandra P, Datta S, Panigrahi R, Banerjee A, Chakrabarti Sh, et al. *Frequency and distribution of hepatitis B virus genotypes among eastern Indian voluntary blood donors: Association with precore and basal core promoter mutations.* Hepatology Research. 2009; 39: 53-59.
9- Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Fukushima K, Kondo Y, Kakazu E, et al. *Enhanced replication of hepatitis B virus with frameshift in the precore region found in fulminant hepatitis patients*. J Infectious Diseases. 2011; 204: 1017-1025.
10- Kar P, Polipali KS, Chattopadhyay S, Hussain Z, Malik A, Husain S, et al. *Prevalence of hepatitis B virus genotype D in precore mutations among chronic liver disease patients from New Delhi, India*. Dig Dis Sci. 2007; 52: 565-569.
11- Montalvo GB, Zapata VL. *Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico*. J Hepatology. 2011; 10 (2): 133-141.
12- Chu CJ, Hussain M, Lok AS. *Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection*. J Hepatology. 2002; 36 (6): 1408-1415.
13- Milani S, Sharifi Z, Hosseini M, Mahmoodian Shooshtari M. *Determination of HBV Genotypes among Hbs Ag Positive Blood Donors in Tehran, Iran Using PCR-RFLP*. Iranian J Publ Health. 2009; 38: 41-47.
14- Montalvo GB, Zapata VL. *Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico*. J Hepatology. 2011; 10 (2): 133-141.
15- Was J, Zhou B, Lia Q, Wang Y, Shen G, Wang Z, et al. *Clinical and virological characteristics of chronic hepatitis B with concurrent hepatitis B e antigen and antibody detection*. J Viral Hepatitis. 2011; 18: 646-652.

Archive of SID

www.SID.ir

16- Davidson F, Lycett C, Sablon E, Petrik J, Dow BC. *Hepatitis B virus genotypes and precore mutations in Scottish blood donors.* J Vox Sanguinis. 2005; 88: 87-92.
17- Wilson C, Muir P, Ballard A, Corden S, Boxall E, Sablon E, Stuyver L. *Evaluation of a line probe assay for identification of hepatitis B virus precore variants in serum from chronic hepatitis B carriers*. J Virological Methods. 2003; 114: 97-103.
18- Biswas A, Banerjee A, Chandra PK, Datta S, Panigrahi R, Dutta D, et al. *Variations in the functional domain of basal core promoter of hepatitis B virus among eastern Indian patients with prevalence of genotypes A, C, and D among the same ethnic population*. J Medical Virology. 2011; 83: 253-260.
19- Huang YH, Wu JC, Chang TT, Sheen IJ, Huo TI, Lee PC, et al. *Association of core promoter/precore mutations and viral load in e antigen-negative chronic hepatitis B patients.* J Viral Hepatitis. 2006; 13: 336-342.
20- Gohi EY, Son BO Y, Kong SK, Chon KM, Cho KS. *Analysis of hepatitis B virus in the cerumen and otorrhea of chronic HBV infected patient.* J Otology & Neurology. 2008; 29: 929-932.
21- Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, Lai MY, Huang WL, Kao JH, et al. *Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers.* J Infectious Diseases. 2006; 193: 1258-1265.
22- Lyoo SK, Hong WS, Song JM, Hur W, Choi JE, Piao LS, et al. *Subgenotype and genetic variability in the precore/core regions of hepatitis B virus in Korean patients with chronic liver disease.* J Intervirology. 2011; 54: 333-338.
23- Xie Y, Zhao H, Dai WS, Xu DZ. *HBV DNA level and antigen concentration in evaluating liver damage of patients with chronic hepatitis B*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2003; 2 (3): 418-422.
24- Vivekanandan P, Bissett S, Ijaz S, Gee T.Ch, Sridharan G, Raghuraman S, et al. *Correlation between hepatitis B genotypes, 1896 precore mutation, virus loads and liver dysfunction in an Indian population.* Indian J Gastroenterol. 2008; 27: 142-147.

Archive of SID

www.SID.ir