

B Tipi Kronik Hepatitde Viral Replikasyon ile Aminotransferaz Seviyeleri ve Histolojik Aktivite Arasındaki İlişki

RELATIONSHIP BETWEEN HISTOLOGICAL ACTIVITY, AMINOTRANSFERASE LEVELS, AND VIRAL REPLICATION IN CHRONIC HEPATITIS TYPE B

Dr.Sabahattin KAYMAKOĞLU*, Dr.Süleyman YALÇIN*, Dr.Selim BADUR**,
Dr.Arif ACAR*, Dr.Atilla ÖKTEN*, Dr.Fatih BEŞİŞİK*, Dr.Yılmaz ÇAKALOĞLU*

İstanbul Tıp Fakültesi *Gastroenterohepatoloji BD, **Mikrobiyoloji ABD, İSTANBUL

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, HBV'ye bağlı kronik hepatitli hastalarda serum HBV DNA'sının, aminotransferaz seviyeleri ve histolojik aktivite üzerine etkisini değerlendirmektir. HBV DNA, hibridizasyon yöntemi ile tayin edildi. Karaciğer biyopsi örnekleri Knodell kriterlerine göre skorlanarak, histolojik aktivite indeksi hesaplandı. Karaciğer hasarı yaptığı bilinen HBV dışı sebeplerin bulunduğu vakalar, çalışma dışı tutuldu. Çalışmaya alınan 38 hasta (28 kronik aktif hepatit, 10 kronik persistan hepatit) iki gruba ayrıldı: 22 HBV DNA (+) vaka (18 erkek, 4 kadın; yaş ort.: 35.8±13.6 yıl) grup I'yi, 16 HBV DNA (-) vaka da (12 erkek, 4 kadın; yaş ort.: 38.8±13.6 yıl) grup II'yi oluşturdu. Grup I'de aminotransferaz seviyeleri, anlamlı derecede daha yüksekti ($p<0.01$). Histolojik aktivite indeksleri yönünden iki grup arasında anlamlı farklılık yoktu. HBV DNA (+) olanlardan 10 vakada HBeAg seropozitifliği vardı. HBeAg/HBV DNA (+) bulunan alt grubun, HBV DNA seviyeleri anti-HBe/HBV DNA (+) olanlardan ($p<0.05$); histolojik aktivite indeksleri ise grup II'den daha yüksekti ($p<0.05$). Bu hastaların ortalama yaşı da, hem anti-HBe/HBV DNA (+) hem de HBV DNA (-) vakalardan anlamlı derecede gençti (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.05$).

B tipi kronik hepatitli hastalarda, viral replikasyonunun aminotransferaz seviyeleri ve kısmen histolojik aktivite ile paralellik gösterdiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: B tipi kronik hepatit, HBV replikasyonu, Histolojik aktivite indeksi

T Klin Gastroenterohepatoloji 1993, 4:35-39

Geliş Tarihi: 2.7.1992

Kabul Tarihi: 22.9.1992

Yazışma Adresi: Prof.Dr.Süleyman YALÇIN
İstanbul Tıp Fakültesi
Gastroenterohepatoloji BD
34390 Çapa
İSTANBUL

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of serum HBV DNA positivity on serum aminotransferase levels and the degree of histological activity in patients with chronic hepatitis related to HBV. HBV DNA in serum was detected by hybridization method. Liver biopsy specimens were scored in a blinded manner according to Knodell's criteria. Cases with hepatotoxic causes other than HBV were excluded. Thirty-eight patients with chronic hepatitis type B (28 with chronic active hepatitis and 10 chronic persistent hepatitis) with respect to their HBV DNA positivity were divided into two groups: group I included 22 HBV DNA (+) patients (18 mean, 4 women; mean age: 35.8±10 yr) and the remaining 16 HBV DNA (-) patients (12 mean, 4 women; mean age: 38.8±13.6 yr) comprised the group II. The serum aminotransferase levels were significantly higher in group I ($p<0.01$). There was no significant difference in histological activity between two groups. Among 22 HBV DNA (+) patients, 10 cases were seropositive for HBeAg. The subgroup of HBeAg/HBV DNA (+) patients had higher levels of HBV DNA and histological activity index. The mean age of these patients was significantly younger than both anti-HBe/HBV DNA (+) and HBV DNA (-) cases ($p<0.01$ and $p<0.05$, respectively).

We concluded that replication of HBV is correlated with serum aminotransferase levels and relatively histological activity in chronic hepatitis type B.

Key Words: Chronic hepatitis type B, Replication of HBV, Histological activity index

Turk J Gastroenterohepatol 1993, 4:35-39

Hepatit B virusu (HBV) direkt sitopatik değildir. Kronik HBV infeksiyonunda karaciğer hücre hasarı hepatosit membranı üzerindeki viral proteinlere karşı meydana gelen immünolojik cevabın sonucudur (1). immünolojik reaksiyonun gücünü ve niteliğini, hem konak hem de virüs ile ilgili çeşitli özellikler belirler.

HBV'nin replikasyon durumu, bunlar arasında en önemlisidir. Replikatif kronik HBV enfeksiyonu, daha progressif ve daha kötü prognoza sahip bir karaciğer hastalığına sebep olur (2). Serumda hepatit B e antijeni (HBeAg) ve hepatit B viral DNA (HBV DNA)'sı, hepatolitte hepatit B "core" antijeni (HBcAg)'nin varlığı, HBV'nin replikasyonuna işaret eden göstergelerdir (3). HBeAg'nin negatif olduğu vakalarda da HBV DNA'nın tesbit edilmesi, HBV DNA'yı en duyarlı ve spesifik serum replikasyon göstergesi özelliğini kazandırmıştır (4).

Bu çalışma, kronik B tipi viral hepatitli hastalarda serum HBV DNA varlığının, transaminaz ve histolojik aktivite üzerine etkisini araştırmak amacı ile planlanmıştır.

MATERYEL VE METOD

İstanbul Tıp Fakültesi, Gastroenterohepatoloji Bilim Dalı'na Ocak 1990-Mayıs 1992 tarihleri arasında peşpeşe başvuran; şikayet, fizik muayene ve laboratuvar bulguları ile karaciğer hastalığı düşünülen vakalardan: a) en az altı aydır hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitif b) karaciğer histolojisi kronik persistan hepatit (KPH) veya sirozsuz kronik aktif hepatit (KAH) bulunanlar çalışmaya dahil edildi. Metabolik, toksik, otoimmün kronik hepatiti olanlar; alkol alanlar; hepatit D ve C virusu göstergeleri (anti-HDV, anti-HCV) pozitif bulunanlar ile asit ve özofagus varisi tesbit edilenler; çalışma dışı tutuldu. Hastalarda homoseksüellik, damar içi uyuşturucu bağımlılığı ve multipl kan transfüzyonu anamnezi yoktu. Her vakanın serolojik ve biyopsimik tetkikleri, karaciğer biyopsisinden en fazla iki ay önceki zaman içinde test edildi. Biyopsimik tetkikler otoanalizörlerle, protrombin zamanı Quick'in tek fazlı pıhtılaşma yöntemine göre yapıldı. Karaciğer biyopsisinin histolojik tanısı, önceden tanımlanan esaslara göre kondu (5). Daha sonra karaciğer biyopsi örnekleri, hastaların klinik ve serolojik özellikleri bildirilmeden, aynı patolog (Dr.S.Y.) tarafından toplu olarak yeniden incelendi. Knodell ve ark. (6)'nın tarif ettiği histolojik aktivite indeksi (HAİ) skorlama yöntemine göre "piecemeal-bridging" nekroz, hepatosellüler dejenerasyon-nekroz, kronik portal inflamasyon ve fibrozisin varlığı ve derecesi oranında puanlar verildi. Bu puanların toplamı, biyopsi örneğinin histolojik aktivitesini gösterdi.

Hepatit B, C ve D virusları ile ilgili göstergelerden HBsAg, HBeAg, hepatit B e antikoru (anti-HBe) ve anti-HDV (Diagnostics Pasteur, France) kitleri kullanılarak, ELISA ile araştırıldı. HBV DNA hibridizasyon yöntemi ile (Abbott Laboratories, Chicago) kit kullanılarak test edildi ve serum düzeyi pg/ml olarak ölçüldü.

Sonuçlar uygunluk durumlarına göre "ki kare" ve "unpaired t testi" ile karşılaştırıldı. $p>0.05$ olan değerler, anlamsız kabul edildi.

BULGULAR

1. Çalışmaya, toplam 38 hasta dahil edildi. HBV DNA (+) bulunan 22 vaka grup I (18 erkek, 4 kadın;

Tablo 1. HBV DNA'sı pozitif ve negatif olan kronik hepatitli hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri

	HBV DNA (+) grup I	HBV DNA (-) grup II
Hasta sayısı	22	16
Yaş (\pm SD yıl)	35.8 \pm 10	38.8 \pm 13.6
E/K	18/4	12/4
KAH/KPH	16/6	12/4
Alkalin fosfataz (\pm SD BLü)	2.1 \pm 0.9	2.1 \pm 1.1
AST (\pm SD ü)*	140.6 \pm 101.8	64.8 \pm 40.6
ALT (\pm SD ü)*	223.4 \pm 165.7	86.1 \pm 62.5
T.bilirubin (\pm SD mg/dl)	0.8 \pm 0.4	0.8 \pm 0.3
Albumin (\pm SD g/dl)	3.8 \pm 0.5	3.8 \pm 0.5
Prot.z. (\pm SD saniye uzama)	1.2 \pm 0.8	1 \pm 0.8
HAİ (\pm SD)**	7.2 \pm 3.6	5.9 \pm 2.5

*: $p<0.01$

:histolojik aktivite indeksi**

yaş ort: 35.8 \pm 10 yıl)'ı, HBV DNA (-) olan 16 hasta (12 erkek, 4 kadın; yaş ort.: 38.8 \pm 13.6 yıl) İse grup II'yi oluşturmuştur. Grup I'dekilerden 16'sı KAH, altısı KPH; grup II'dekilerden 12'si KAH, dördü KPH'tir. Gruplar arasında yaş, cins ve kronik hepatitin dağılımı yönünden anlamlı bir fark yoktur (Tablo 1).

2. HBV DNA (+) hastaların ortalama aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri, HBV DNA (-) vakalardan anlamlı derecede daha yüksektir ($p<0.01$). HAİ grup I'de daha fazla olmasına rağmen, aradaki fark istatistikî anlamlılığa ulaşmamıştır (Tablo 1).

3. Grup I ve II'nin alkalin fosfataz, total bilirubin, albumin ve protrombin zamanı (kontrol değerine göre saniye uzama) değerleri arasındaki farklar anlamsızdır (Tablo 1).

4. HBV DNA (+) bulunan hastalar, HBeAg(+) ve anti-HBe (+) olmasına göre iki alt gruba ayrıldı.

- Yedisi KAH, üçü KPH 10 vaka (dokuz erkek, bir kadın; yaş ort.: 29.5 \pm 4.1 yıl) HBeAg/HBV DNA (+) grubu (grup Ia); dokuz KAH, üç KPH toplam 12 vaka da (dokuz erkek, üç kadın; yaş ort.: 41.1 \pm 10.6 yıl) anti-HBe/HBV DNA (+) grubu (grup Ib) teşkil etti. Gruplar arasında cins ve kronik hepatitin tipi yönünden bir fark olmamasına rağmen, HBeAg/HBV DNA (+) hastalar anlamlı derecede ($p<0.01$) daha gençti (Tablo 2).
- Grup Ia ve grup Ib'deki hastaların ortalama alkalin fosfataz, AST, ALT, total bilirubin, albumin, protrombin zamanı ve HAİ değerleri arasındaki farklar anlamsızdı (Tablo 2).
- HBeAg/HBV DNA (+) vakaların HBV DNA düzeyleri, anti-HBe/HBV DNA (+) olanlardan anlamlı derecede ($p<0.05$) daha yüksekti (Tablo 2).

Tablo 2. HBV serolojisi HBeAg/HBV DNA (+) ve anti-HBe/HBV DNA (+) bulunan kronik hepatitli hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri

	HBeAg/ HBV DNA (+) grup Ia	anti-HBe/ HBV DNA (+) grup Ib
Hasta sayısı	10	12
Yaş (±SDyıl)*	29.5±4.1	41.1±10.6
E/K	9/1	9/3
KAH/KPH	7/3	9/3
Alkalen fosfatase (±SD BLü)	2.2±1	1.9±0.8
AST (±SD ü)	184.4±145.3	112.4±75.9
ALT (±SD g/dl)	270±182.1	184.5±147.2
T.bilirubin (±SD mg/dl)	1±0.4	0.6±0.2
Albumin (±SD g/dl)	3.8±0.2	3.6±0.5
Prot.z. (±SD saniye uzama)	1.1±0.7	1.2±0.9
HBV DNA titre (±SD pg/ml)**	129.9±105.6	44.8±4
HAİ (±SD)**	8.2±2.7	6.8±4

*:p<0.01

**:p<0.05

***:histolojik aktivite indeksi

5. Grup Ia ve grup Ib, grup II ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında:

- HBeAg/HBV DNA (+) hastaların yaşı, grup II'den daha küçüktü (p<0.05), grup Ib ve II arasındaki anlamlı yaş farkı yoktu.
- Ortalama alkalen fosfatase, total bilirubin, albumin ve protrombin zamanları birbirine benzer bulundu.
- Ortalama AST ve ALT düzeyleri grup Ia (sırasıyla p<0.01 ve p<0.001) ve grup Ib'de (sırasıyla p<0.05 ve p<0.05), grup II'ye göre anlamlı derecede yüksekti.
- HBeAg/HBV DNA (+) hastaların ortalama HAİ, grup H'den anlamlı olarak (p<0.05) daha fazla olmasına rağmen; grup Ib ile grup H'nin farklılığı anlamsız bulundu.

Karaciğer biyopsilerinin histopatolojik değerlendirmesine göre kronik hepatitler KPH, KAH ve kronik lobüler hepatit olarak üçe ayrılır (7). HBV ile, her üç tip kronik hepatit meydana gelebilir. Eskiden KPH'in daha hafif seyidi ve iyi prognoza sahip, buna karşılık KAH'ın daha ciddi bir karaciğer hastalığı olduğuna inanılırdı (8). Ancak, replikatif HBV'ye bağlı KPH'lerin sıklıkla KAH ile siroza ilerlediğinin gösterilmesi (9,10) ve kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyirinin daha iyi anlaşılması, kronik B tipi viral hepatitli vakalarda viral replikasyon ve karaciğer hücre inflamasyonuna dayanan yeni bir sınıflamayı gündeme getirmiştir: HBeAg-pozitif; HBeAg-negatif, AST-pozitif; HBeAg-negatif, AST-negatif kronik hepatit B (3). O halde, viral replikasyonun bu önemi nereden ileri gelmektedir?

Kronik HBV enfeksiyonunda, HBV'nin "nucleocapsid" antijenleri (HBeAg ve HBcAg) enfekte hepatositi, sitotoksik T-lenfositleri için bir hedef haline getirirler (10). Özellikle sitoplazmik HBcAg'nin bulunması ile karaciğer hücresinin sitolizi arasında kesin bir ilişki olduğu gösterilmiştir (11). Öte yandan, hepatositlerde HBcAg varlığı ile serum HBV DNA'sı arasında da pozitif bir korelasyon saptanmıştır (12). Buna göre, kronik HBV enfeksiyonunda viral replikasyon, karaciğerin immünolojik zemine hasara uğraması için uygun ortamı hazırlayan asıl faktördür. Sonuçta, aminotransferaz düzeylerinde yükselme ve semptomatolojinin başlaması ile karakterli, karaciğer hücre inflamasyonunda artış meydana gelmektedir (3). Kronik B tipi viral hepatitte, hepatik inflamasyonun derecesi ile viral replikasyonu gösteren HBV DNA ve HBeAg arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (13,14). Lobüler inflamasyonlu vakalarda, inflamatuvar olayı yansıtan serum aminotransferazları daha yüksek düzeydedir. Dolayısı ile, HBeAg/HBV DNA (+) hastalarımızda hem transaminaz, hem de histolojik aktivitenin en yüksek bulunmasının sebebi budur. Fakat, grup I ve II arasında aminotransferaz seviyeleri yönünden anlamlı fark olmasına rağmen, histolojik aktiviteleri arasındaki farkın anlamsız bulunması; biyoşimik ve histolojik aktivitenin tam bir paralellik göstermediğini düşündürmüştür. HBV replikasyonunun ileri derecede arttığı durumlarda, aksine hepatositte "MHC class I" sunusu azalmakta, bu da aktif T-lenfositleri tarafından hücrenin tanınmasını engelleyerek, bir nevi immünolojik korunma meydana gelmektedir (15). Çalışmaya anti-HDV (+) bulunduğu için dahil edilmeyen ve HBV DNA düzeyi 3853 pg/ml bulunan kronik aktif hepatitli ve kronik böbrek yetersizlikli bir hastanın serum transaminazlarının (AST: 24'ü, ALT: 41'ü) ve histolojik aktivitesinin (HAİ: 7), bu izaha uyar şekilde düşüklüğü dikkati çekmiştir.

Hepatit B e antijeni ve viral DNA'sı pozitif bulunan hastalarımızın yaşı, HBeAg (-) gruplardan daha küçük bulunmuştur. Keza, bu vakaların HBV DNA seviyeleri de, antiHBe/HBV DNA (+) olanlardan anlamlı derecede yüksektir. Chu ve ark. (13) da benzer sonuçları tesbit etmişlerdir. Bu bulgular, kronik HBV enfeksiyonunun başlangıç döneminde HBeAg pozitifliği ile birlikte yüksek replikatif bir faz olduğu, daha sonra HBeAg/anti-HBe serokonversiyonu ile düşük replikatif faza geçişin meydana geldiğini göstermektedir.

Hepatit B e antikoru pozitif bazı vakalarda HBV DNA'nın tesbit edilmesi, bu hastaların pre-C bölgesindeki mutasyonlardan dolayı HBeAg sekrete edemeyen "mutant" HBV suşları ile enfekte olduğunu düşündürmüştür. Pre-C'nin nükleotid dizisinde farklı aminoasitlerin gösterilmesi, "mutant" suşların varlığını kesinleştirmiştir (16). Kronik "mutant" HBV enfeksiyonları genellikle spontan remisyon ihtimalinin azlığı, siroza ilerlemenin sıklığı ve anti-viral tedaviden sonra nüks oranlarının yüksekliği ile klasik HBeAg-pozitif HBV for-

mundan ("wild" tip) ayrılırlar (17). Ancak, anti-HBe/HBV DNA (+) her kronik hepatitli hastada, "mutant" HBV susu bulunmaz. Bu vakaların bir kısmı, HBeAg'nin tesbit edilemeyecek derecede düşük olması veya anti-HBe ile kompleksler oluşturması sebebi ile HBeAg'nin saptanamadığı klasik HBV suşları ile infekteldir (18). Hepatositi immünolojik hedef haline getiren antijenlerden biri olan HBeAg'nin bulunmaması, infekte hücreyi ortadan kaldırmak isteyen immun sistemin etkisini azaltır. HBeAg-defektif HBV, devamlı ancak etkisiz bir immun reaksiyona sebep olur. Bu immünolojik ataklar, daha ciddi ve daha uzun süreli bir kronik hepatite yol açar (19). Nitekim, anti-HBe/HBV DNA (+) hastalarımızda artmış hepatic inflamasyona işaret eden yüksek aminotransferaz düzeyleri tesbit edilmiştir. Aynı anlamli yükseklik, HAI'nde saptanmamıştır. Paralelliğin bulunmayışının sebebi, Knodell skorlamasının inflamasyon dışı parametreleri de değerlendirmesi olabilir.

Viral replikasyonun durması selim, ilerleyici olmayan bir karaciğer hastalığı ile ilişkili olduğu için; HBeAg'den anti-HBe'ye serokonversiyon genellikle biyoşimik ve histolojik bir remisyon meydana getirir (20,21). Nonreplikatif faza giren hastalarımızda, transaminazlar anlamli derecede düşük bulunmuştur. Ancak, bu gruptaki beş vakanın serum aminotransferazları normalin dört katının üzerindedir. Anti-HBe (+) kronik hepatitte karaciğer hastalığının aktivitesinin sürmesi; viral replikasyonun devamı, diğer hepatotoksik faktörlerin eklenmesi veya HBV ile tetiklenen otoimmun olayların devam etmesi ile ilişkili olabilir (22,23). Karaciğer hasarına yol açan diğer sebeplerin elimine edildiği vakaların çalışmaya alınması, mevcut bulgularımızın sadece HBV ile ilgili olduğunu ve muhtemelen bu hastalarda düşük düzeyde de olsa viral replikasyonun devam ettiğini düşündürmektedir. Nitekim, anti-HBe (+) birçok kronik HBV infeksiyonlu vakanın karaciğerinde HBeAg'nin bulunması (24), hibridizasyon yöntemleri ile serumda HBV DNA'nın tesbit edilemediği durumlarda, HBV'nin nonreplikatif faza girdiğinin kesin olarak söylenemeyeceğine işaret etmektedir. "Polymerase chain reaction" yöntemi ile. bu hastaların önemli bir kısmında HBV DNA saptanabilir (25). Anti-HBe serokonversiyonu ile histolojik iyileşme arasında da tam bir paralellik mevcut değildir (20). Grup II'deki vakalarımızın HAI'leri, HBV DNA (+) gruba göre anlamli bir fark göstermemiştir.

Sonuçlarımız, HBV DNA (+) kronik B tipi viral hepatitli hastalarda aminotransferaz aktivitesinin fazla olduğunu, yüksek replikatif fazdaki hastalarda ayrıca histolojik aktivitenin de arttığını göstermektedir. Ancak, biyoşimik aktivite (AST ve ALT düzeyleri) her zaman, histolojik aktiviteye paralel değildir. Kronik hepatitte siroza ilerlemeyi tayin eden en önemli faktör, hepatic inflamasyonun derecesidir (26). Bu nedenle, replikatif HBV'ye bağlı kronik hepatitli vakalarda viral replikasyon mutlaka durdurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Thomas HC, Montano L, Goodall A, de Koning R, Oladapo J, Wiedman KH. Immunological mechanisms in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1982; 2:116S-21S.
2. Schalm SW, Heijink RA. Spontaneous disappearance of viral replication and liver cell inflammation in HBsAg-positive chronic active hepatitis: results of a placebo vs. interferon trial. *Hepatology* 1982; 2:791-4.
3. Schalm SW, Thomas HC, Hadziyannis S J. Chronic hepatitis B. In: Popper H, Schaffner F, eds. *Progress in Liver Disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1990: IX:443-62.
4. Bonino F. The importance of hepatitis B viral DNA in serum and liver. *J Hepatol* 1986; 3:136-41.
5. Bianchi L, De Groote J, Desmet V J, et al. Acute and chronic hepatitis revisited. *Lancet* 1977; ii:914-9.
6. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histologic activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1:431-5.
7. Popper H, Schaffner F. The vocabulary of chronic hepatitis. *N Engl J Med* 1971; 284:1154-56.
8. Becker MD, Scheuer PJ, Baptista A, Sherlock S. Prognosis of chronic persistent hepatitis. *Lancet* 1970; i:53-7.
9. Aldershvile J, Dietrichson O, Skinhoj P, et al. Chronic persistent hepatitis: serological classification and meaning of the hepatitis B e system. *Hepatology* 1982; 2:243-6.
10. Pignatelli M, Waters J, Lever AML, et al. Cytotoxic T-cell responses to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic hepatitis. *J Hepatol* 1987; 4:15-21.
11. Naoumov NV, Portmann BC, Tedder RS, et al. Detection of hepatitis B virus antigens in liver tissue. A relation to viral replication and histology in chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 1990; 99:1248-53.
12. Govindarajan S, Fong T-L, Valinluck B, Edwards V, Redeker AG. Markers of viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. *AJCP* 1988; 89:233-7.
13. Chu C-M, Fowler MJF, Monjardino J, Liaw Y-F, Thomas HC. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 1985; 5:431-4.
14. Paz MOA, Brenes F, Karayannis P, et al. Chronic hepatitis B virus infection. Viral replication and patterns of inflammatory activity: serological, clinical and histologic correlations. *J Hepatol* 1986; 3:371-6.
15. Mills CT, Lee E, Perrillo R. Relationship between histology, aminotransferase levels, and viral replication in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1990; 99:519-24.
16. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; ii:588-90.

17. Brunetto MR, Oliveri F, Rocca G, et al. Natural course and response to interferon of chronic type B hepatitis, accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. *Hepatology* 1989; 10:198-203.
18. Naoumov NV, Schneider R, Grotzinger T, et al. Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology* 1992; 102:538-43.
19. Bonino F, Brunetto MS, Rizzetto M, Will H. Hepatitis B virus unable to secrete e antigen (editorials). *Gastroenterology* 1991; 100:1138-41.
20. Realdi G, Alberti A, Rugge M, et al. Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1980; 79:195-9.
21. Hoognagle JH, Dusheiko GM, Seeff LB, et al. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann Intern Med* 1981; 94:744-8.
22. Thomas HC, Pignatelli M, Scully LJ. Viruses and immune reactions in the liver. *Scand J Gastroenterol* 1985; 114(Suppl):105-17.
23. Fattovich G, Rugge M, Brollo L, et al. Clinical, virologic and histologic outcome following seroconversion from HBeAg to anti-HBe in chronic hepatitis type B. *Hepatology* 1986; 6:167-72.
24. Hadzlyannis SJ, Lieberman HM, Karvountais GG, Shafritz DA. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 1983; 5:656-62.
25. Lorient M-A, Marcellin P, Bismuth E, et al. Demonstration of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in the serum and the liver after spontaneous or therapeutically induced HBeAg to anti-HBe or HBsAg to anti-HBs seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1992; 15:32-6.
26. Popper H. Changing concepts of the evolution of chronic hepatitis and the role of piecemeal necrosis. *Hepatology* 1983; 3:758-62.