

PENENTUAN JUJUKAN NUKLEOTID BAHAGIAN PRE-KOR GENOM VIRUS
HEPATITIS B DALAM PESAKIT YANG POSITIF
TERHADAP HBsAg DI MALAYSIA



TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH
SARJANA SAINS PERUBATAN

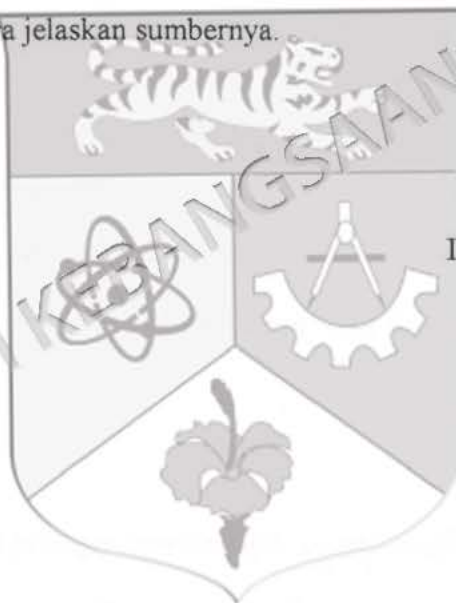


FAKULTI PERUBATAN
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR
2000

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

27 Julai 2000




ISKANDAR KASSIM
11643

PENGHARGAAN

Saya ingin merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia saya, Prof. Ton So Har, Jabatan Biokimia Fakulti Perubatan U.K.M. di atas segala bimbingan, nasihat, kritikan membina dan kemudahan teknikal selama tempoh menjalankan kajian dan penulisan tesis ini.

Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Mohd. Mazlam Zawawi dari Hospital U.K.M. dan Dr. Thanaletchimy dari Hospital Tengku Ampuan Rahimah Klang kerana telah membekalkan sampel dan memberikan bantuan teknikal bagi menjayakan projek ini.

Tidak lupa juga saya ingin mengucapkan terima kasih kepada Ketua Jabatan Biokimia, U.K.M. dan Penolong Pegawai Sains Perubatan Kanan, Cik Noriah Ramli serta kakitangan Jabatan Biokimia kerana bantuan teknikal dan kerjasama yang diberikan sepanjang projek ini dijalankan.

ABSTRAK

Perubahan kecil yang berlaku pada jujukan nukleotid virus Hepatitis B (HBV) memberi kesan yang besar kepada struktur dan fungsi virus tersebut. Contohnya, kehadiran mutasi kodon penamat pada bahagian pre-kor genom HBV dalam pesakit yang negatif terhadap HBeAg telah dikaitkan dengan keadaan viremia berterusan dan kerosakan hepar yang lebih teruk lagi. Kajian dilakukan ke atas 265 pesakit yang positif terhadap HBsAg yang dikategorikan kepada tiga kumpulan iaitu pembawa asimptomatik (ASC), pesakit kronik (CC) dan pesakit hepatoma (HCC). Pengesanan HBV-DNA dijalankan secara PCR dan sampel yang positif kemudiannya dilakukan penentuan jujukan (terutamanya kodon 15 dan kodon 28) menggunakan teknik 'enzymatic sequencing' atau teknik kombinasi PCR dengan tindakan enzim restriksi. HBV-DNA dikesan di dalam 95 pesakit [ASC=15 (38.5%), CC=69 (34.7%), HCC=11 (40.7%)]. Kehadiran HBV-DNA tidak mempunyai hubungan bermakna dengan kumpulan pembawa ($X^2 = 8.184$, $P = 0.0017$). Bagi analisis penentuan jujukan pre-kor, varian T-1858 telah ditemui dalam 78 pesakit (ASC=14, CC=54 HCC=10), varian C-1858 dalam 14 pesakit (ASC=1, CC=12 dan HCC=1), manakala tiga pesakit didapati mengandungi campuran varian C/T-1858. Varian G-1896 ditemui dalam 92 pesakit (ASC=15, CC=67, HCC=10), manakala tiga pesakit lagi mengandungi varian G/A 1896. Dalam kumpulan ASC, didapati 14 pembawa dijangkiti oleh varian T-1858 dan masing-masing lima adalah positif terhadap HBeAg dan 9 yang lain adalah positif terhadap anti-HBe; satu pesakit dijangkiti oleh varian C-1858 dan ianya adalah positif terhadap HBeAg. Bagi kumpulan CC, didapati 54 pesakit dijangkiti oleh varian T-1858 dan masing-masing 27 adalah positif terhadap HBeAg, 25 positif terhadap anti-HBe, satu negatif terhadap HBeAg/anti-HBe dan satu lagi positif terhadap HBeAg/anti-HBe; 12 pesakit dijangkiti oleh varian C-1858 dan masing-masing 8 adalah positif terhadap HBeAg dan 4 adalah positif terhadap anti-HBe; 3 pesakit dijangkiti oleh kedua-dua varian C/T-1858 dan kesemuanya adalah positif terhadap HBeAg. Varian C atau T-1858 tidak menunjukkan hubungan bermakna dengan kehadiran HBeAg/anti-HBe ($X^2 = 0.855$, $P = 0.355$). Dalam kumpulan HCC, 10 pesakit dijangkiti oleh varian T-1858, masing-masing 7 pesakit adalah positif terhadap anti-HBe dan 3 lagi negatif terhadap kedua-dua HBeAg dan anti-HBe. Tiada pesakit yang dijangkiti oleh varian A-1896 (mutasi kodon penamat) secara eksklusif dan hanya tiga pesakit (daripada semua kumpulan) yang dijangkiti oleh campuran A/G-1896 dan masing-masing satu pesakit adalah positif terhadap HBeAg dan dua lagi positif terhadap anti-HBe. Kajian ini menunjukkan kebanyakan pembawa HBsAg di Malaysia dijangkiti oleh varian T-1858 dan hanya segelintir pembawa yang jangkiti oleh virus yang mempunyai mutasi kodon penamat pada kodon 28.

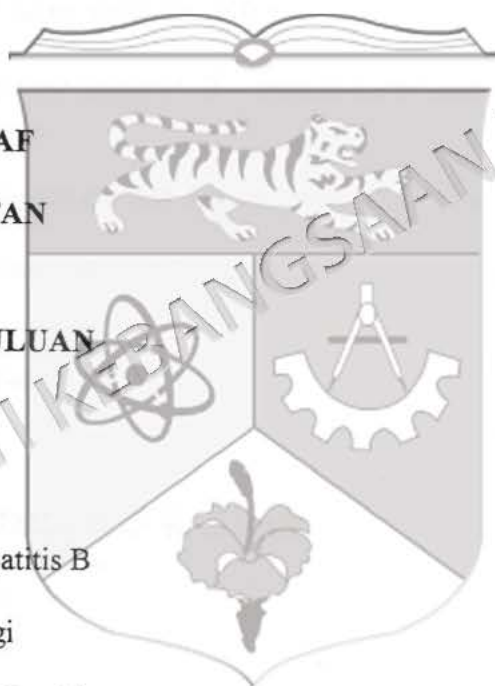
NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE PRE-CORE REGION OF HEPATITIS B VIRUS GENOME IN HBSAG-POSITIVE MALAYSIAN CARRIERS.

ABSTRACT

Small changes in the nucleotide sequence of hepatitis B virus (HBV) can have major consequences on its structure and function. For example, emergence of stop codon mutation in the pre-core region of HBV in HBeAg-negative patients have been associated with viremia and severe liver damage. This study was carried out on 265 HBsAg-positive carriers, classified into three groups; asymptomatic carriers (ASC), chronic carriers (CC) and hepatoma patients (HCC). Detection of HBV-DNA was done using PCR and the positive samples were later sequenced using enzymatic sequencing or by combination of PCR followed by restriction enzyme treatment. HBV-DNA was detected in 95 samples [ASC=15 (38.5%), CC=69 (34.7%), HCC=11 (40.7%)]. There was no significant difference between the presence of HBV-DNA with the carrier groups ($X^2=8.184$, $P=0.0017$). Sequencing of the pre-core showed that, T-1858 variant was found in 78 samples (ASC=14, CC=54, HCC=10), C-1858 variant in 14 patients (ASC=1, CC=12, HCC=1) and coinfection of C/T-1858 variant in 3 CC patients. G-1896 variant was found in 92 patients (ASC=15, CC=67, HCC=10), while only three patients were infected with both G/A-1896 variant. In the ASC group, 14 patients were infected with T-1858 variant (5 patients were HBeAg positive and 9 were anti-HBe positive); and one sample was infected with C-1858 variant which was positive for HBeAg. In the CC group, 54 patients were infected with the T-1858 variant (27 were HBeAg positive, 25 were anti-HBe positive, one each was HBeAg/anti-HBe positive and HBeAg/anti-HBe negative), 12 patients were infected with C-1858 variant (8 were HBeAg positive and 4 were anti-HBe positive) and 3 patients were infected with both C/T-1858 variant which were positive for HBeAg. There was no significant difference between C or T-1858 variant with the presence of HBeAg/anti-HBe ($X^2=0.855$, $P=0.355$). In the HCC group, 10 patients were infected with the T-1858 variant, (7 patients were anti-HBe positive and 3 patients were negative for both HBeAg and anti-HBe). No sample was found infected with A-1896 variant (stop codon mutation) exclusively and only 3 patients (from all groups) were infected with both A/G-1896 (one sample was HBeAg positive and two were anti-HBe positive). This study showed that most HBsAg-positive carriers in Malaysia were infected with the T-1858 variant and only a small number carriers were infected by the virus with stop codon mutation at codon 28.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTOGRAF	xii
SENARAI SINGKATAN	xiii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Hepatitis B	2
1.3 Sejarah Hepatitis B	2
1.4 Epidemiologi	3
1.5 Patogenesis Jangkitan HBV	4
1.5.1 Jangkitan akut	5
1.5.2 Jangkitan kronik	6
1.6 Dinamik viral dalam jangkitan HBV	7
1.7 Virus Hepatitis B	8
1.8 HBV-DNA	9
1.9 Organisasi genom HBV	12
1.10 Antigen-antigen dan penanda HBV	14



1.10.1	Antigen permukaan (HBsAg)	
1.10.2	Antigen Kor (HBcAg)	
1.10.3	Antigen e (HBeAg)	
1.10.4	Antigen x (HBxAg)	
1.10.5	Hepatitis B DNA (HBV-DNA)	
1.10.6	DNA Polimerase Hepatitis B (HBV-DNA Polymerase)	18
1.11	Kitar replikasi HBV	19
1.12	Profil serodiagnosis terhadap penanda HBV	22
1.12.1	Penanda HBV dalam jangkitan akut dan kronik	
1.12.2	Pembawa senyap (pembawa asimptomatik)	
1.13	HBV-DNA dalam jangkitan HBV	26
1.14	Hubungan mutasi genom HBV dengan keterukan penyakit hepatitis	28
1.15	Hubungan mutasi pre-kor dengan penanda HBeAg/HBe	30
1.16	Struktur 'stem-loop' di dalam isyarat enkapsidasi pre-genom HBV	32
1.17	Objektif kajian	33
BAB II BAHAN KIMIA DAN KAEDAH		
2.1	Bahan Kimia	36
2.2	Sampel	40
2.3	Kaedah	40
2.3.1	Penyediaan kontrol HBV-DNA daripada plasmid pHBV- 20	41
2.3.2	Pengesanan HBsAg	44
2.3.3	Pengesanan HBeAg dan anti-HBe	44
2.3.4	Pengesanan anti-HCV	47
2.3.5	Pengesanan anti-HDV	48
2.3.6	Ekstraksi HBV-DNA daripada serum	50
2.3.7	Amplifikasi HBV-DNA melalui PCR dan 'sequencing'	51
2.3.8	Amplifikasi HBV secara teknik PCR	51
2.3.9	Presipitasi DNA	53
2.3.10	Analisa DNA yang diamplifikasikan dengan teknik elektroforesis	54

2.3.11	Penentuan jujukan nukleotid melalui teknik 'sequencing' enzimatik terminasi rantai Sanger	54
2.3.12	Langkah-langkah penentuan jujukan nukleotid gen pre-kor/kor secara teknik 'sequencing' enzimatik	55
2.3.13	Autoradiografi	56
2.3.14	Penentuan bahagian pre-kor menggunakan teknik PCR dan tindakan enzim restriksi	57
2.3.15	Langkah-langkah PCR dengan tindakan enzim restriksi	59
2.4	Analisis statistik	60

BAB III HASIL

3.1	Umum	62
3.2	Kehadiran anti-HCV dan anti-HDV dalam pembawa HBsAg	71
3.3	Amplifikasi HBV-DNA melalui teknik PCR	71
3.4	Hubungan HBV-DNA mengikut kumpulan ASC, CC dan HCC	75
3.5	Penentuan jujukan nukleotid bahagian pre-kor genom HBV	77
3.6	Hubungan antara varian HBV dengan penanda HBeAg/anti-HBe mengikut kumpulan ASC, CC dan HCC	81

BAB IV PERBINCANGAN

4.1	Amplifikasi dan pengesanan HBV-DNA serum melalui teknik PCR	86
4.2	Penentuan jujukan nukleotid pre-kor genom HBV	88
4.3	Hubungan di antara HBV-DNA, HBeAg/anti-HBe dengan kumpulan pembawa ASC, CC dan HCC	90
4.4	Hubungan di antara varian C/T-1858 dan G/A-1896 dengan kumpulan pembawa ASC, CC dan HCC	92
4.4.1	Analisis kodon 15	92
4.4.2	Analisis kodon 28	94
4.5	Hubungan di antara varian C/T-1858 (kodon 15) dan G/A-1896 (kodon28) dengan penanda HBeAg	96

4.5.1	Kumpulan pembawa asimptomatik (ASC)	96
4.5.2	Kumpulan pembawa kronik (CC)	97
4.5.3	Kumpulan pengidap kanser hepar (HCC)	98
4.6	Hubungan HCV dengan HBV-DNA	99
4.7	Hubungan HBV dengan HDV	99
4.8	Faktor yang menyebabkan mutasi berlaku	100
4.9	Perbincangan keseluruhan	103
4.10	Kesimpulan	105
4.11	Kajian lanjutan	107

RUJUKAN

109



SENARAI JADUAL

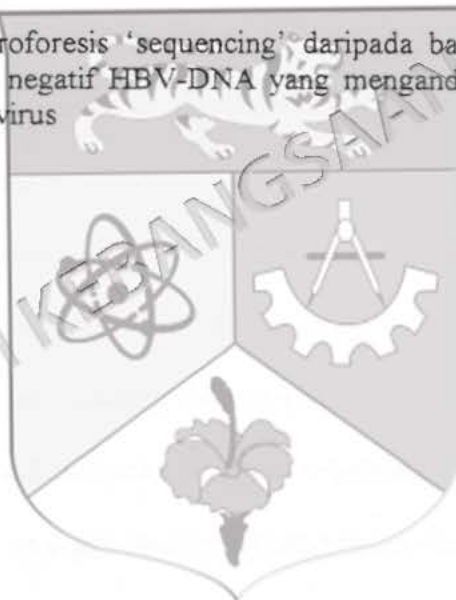
No. Jadual		Halaman
2.1	Primer-primer yang digunakan dan tapak bagi tindakan enzim restriksi	58
3.1	Jadual menunjukkan ringkasan data-data yang diperolehi daripada sampel pembawa yang positif terhadap HBV-DNA	67
3.2	Ringkasan bagi jumlah varian HBV pada pembawa sihat (ASC), pesakit hepatitis kronik (CC) dan hepatoma (HCC)	70
3.3	Taburan pembawa HBsAg mengikut kehadiran HCV, HDV dan HBV-DNA	72
3.4	Perbezaan pengesanan HBV-DNA yang positif melalui PCR tunggal dan PCR 'nested' mengikut kumpulan pembawa HBsAg	74
3.5	Hubungan HBV-DNA dengan kumpulan ASC, CC dan HCC	76
3.6	Hubungan di antara varian HBV dengan penanda HBeAg/anti-HBe	83
4.1	Mutasi titik (G→A) pada nukleotid 1896 (kodon 28) bahagian pre-kor yang bergantung kepada genotype	93

SENARAI RAJAH

No. Rajah		Halaman
1.1	Ilustrasi Zarah Hepatitis B Virus	10
1.2	Virus hepatitis B atau partikel Dane	11
1.3.	Perwakilan skematik genom HBV seperti yang terdapat pada partikel virus	13
1.4	Kitar hidup virus hepatitis B	20
1.5	Proses replikasi HBV	21
1.6	Penanda-penanda yang dapat dikesan dalam jangkitan akut dan kronik HBV	25
1.7	Perpasangan bes antara nukleotid 1958 dan 1896 di dalam struktur stem-loop RNA virus hepatitis B.	34
2.1	Interpretasi visual keputusan ujian HBeAg/anti-HBe	45
2.2.	Protokol ujian immunoassai yang digunakan dalam pengesanan antibodi terhadap virus HCV dan HDV di dalam serum	49
2.3	Jujukan sasaran untuk amplifikasi DNA	52
3.1	Taburan pembawa HBsAg mengikut jantina	64
3.2	Taburan pembawa HBsAg mengikut etnik	65
3.3	Perbandingan jujukan nukleotid pre-kor genom HBV	78
4.1	Tapak-jalan sintesis dan sekresi HBeAg dan sekatan yang mungkin terjadi disebabkan oleh mutasi pada bahagian promoter dan pre-kor genom HBV	102

SENARAI FOTOGRAF

No. Foto		Halaman
2.1	Jalur-jalur DNA yang diperolehi setelah plasmid pHBV-20 ditindakkan dengan enzim restriksi EcoRI	43
3.1	Gel elektroforesis PCR daripada HBV-DNA	73
3.2	Gel elektroforesis menggunakan kaedah PCR dengan tindakan enzim restriksi	79
3.3	Gel elektroforesis 'sequencing' daripada bahagian pre-kor bebenang negatif HBV-DNA virus jenis liar (T-1858, WT) dan mutan	80
3.4	Gel elektroforesis 'sequencing' daripada bahagian pre-kor bebenang negatif HBV-DNA yang mengandungi campuran dua jenis virus	82



SENARAI SINGKATAN

Ab	Antibodi
Ag	Antigen
BSA	Albumin serum bovin (Bovine serum albumin)
HAV	Virus hepatitis A (Hepatitis A virus)
HBV	Virus hepatitis B (Hepatitis B virus)
HCV	Virus hepatitis C (Hepatitis C virus)
HDV	Virus hepatitis delta (Hepatitis delta virus)
HEV	Virus hepatitis E (Hepatitis E virus)
HGV	Virus hepatitis G (Hepatitis G virus)
HBsAg	Antigen permukaan hepatitis B (Hepatitis B surface antigen)
HBeAg	Antigen e hepatitis B (Hepatitis B e antigen)
HBcAg	Antigen kor hepatitis B (Hepatitis B core antigen)
Anti-HBs	Antibodi terhadap antigen s hepatitis B
Anti-HBe	Antibodi terhadap antigen e hepatitis B
DNA	Asid deoksiribonukleik (Deoxyribonucleic acid)
dsDNA	Bebenang berganda DNA (double-stranded DNA)
bp	Pasangan bes (base pair)
nt	Nukleotid

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Hepatitis adalah inflamasi hepar yang bukan sahaja disebabkan oleh jangkitan virus, agen toksik atau dadah, tetapi juga disebabkan oleh respons autoimun. Tanda-tanda hepatitis adalah seperti jaundis, hepatomegali (pembesaran hepar) dan kadang-kadang demam. Ianya boleh menjadi 'mild', atau akut diikuti dengan hepatitis fulminant, ataupun kronik. Jika hepatitis adalah disebabkan oleh virus atau alkohol secara kronik, ia boleh menyebabkan sirosis dan kanser hepar (Kumar et al. 1992; Ganem 1996)

Terdapat beberapa jenis virus hepatitis seperti virus hepatitis A (HAV; sebelumnya dikenali sebagai hepatitis berjangkit), virus hepatitis B (HBV; hepatitis serum), virus hepatitis C (HCV; sebelumnya dikenali sebagai hepatitis non-A, non-B), virus hepatitis delta (HDV), HEV (sejenis virus yang ditransmisi melalui feces pembawa yang dijangkiti), HGV dan virus kriptogenik (disebabkan oleh virus yang belum dikenal-pasti) (Blumberg 1997). Lain-lain virus adalah seperti Yellow Fever Virus, Epstein Barr Virus (EBV) dan sitomegalovirus (CMV) termasuk parasit dan

bakteria boleh menyebabkan hepatitis sebagai kesan kedua (secondary effect) (Kumar et al. 1992).

1.2 HEPATITIS B

Hepatitis B adalah disebabkan oleh virus hepatitis B (HBV) (Galasso et al. 1990). HBV telah diketahui mempunyai kepentingan dalam bidang perubatan kerana ianya menjangkiti lebih suku bilion orang (Ganem 1996). Blumberg (1997) pula menyatakan terdapat lebih 350 ribu pembawa HBV di dunia dan kebanyakan mereka adalah terdedah kepada risiko yang boleh memendekkan hayat. Dijangkakan terdapat lebih kurang 5000 kematian di Amerika Syarikat dan satu juta kematian di dunia setiap tahun adalah disebabkan oleh HBV. HBV dan juga HCV telah dikenalpasti sebagai virus hepar yang menjadi penyebab utama sirosis dan kanser hepar (karsinoma hepatoselular) (Blumberg 1997). HBV juga adalah satu contoh di mana vaksin rekombinan untuk penyakit berjangkit manusia yang mula-mula sekali dicipta dengan jayanya. Vaksin untuk lain-lain jangkitan transmisi seksual seperti HIV misalnya masih belum berjaya dihasilkan (Ganem 1996)

1.3 SEJARAH HEPATITIS B

Jaundis iaitu penyakit kekuningan akibat hepatitis jangkitan virus dikenali sejak zaman sebelum Masehi lagi. Bermula dari tahun 1839 telah diketahui bahawa hepatitis adalah diakibatkan oleh nekrosis hepatosit dan penyakit ini merebak pada pertengahan Perang Dunia Kedua (Zurkerman 1976). Walau bagaimanapun hepatitis dipastikan

sebagai penyakit berjangkit yang disebabkan oleh virus hanya selepas Perang Dunia Kedua berakhir (Havens et al. 1944).

Kajian pesat terhadap hepatitis telah dijalankan dari tahun 1940 hingga tahun 1960. Tetapi era baru yang terpenting dalam penyelidikan hepatitis bermula selepas penemuan antigen Australia (HBsAg) oleh Blumberg dan rakan-rakannya pada tahun 1965 (Blumberg et al. 1965) dan hubungannya dengan penyakit Hepatitis B itu sendiri. HBsAg pada mulanya dikenali sebagai antigen Australia kerana Blumberg dan rakan-rakannya telah menemui HBsAg secara tidak sengaja di dalam serum orang asli Australia (Kumar et al. 1992) semasa mengkaji polimorfism protein pesakit yang kerap menerima pemindahan darah pada masa itu (Ton 1989).

1.4 EPIDEMIOLOGI

Hepatitis adalah penyakit yang terjadi secara berkelompok ataupun terjadi kepada kumpulan orang yang tinggal di dalam kawasan yang mempunyai taraf higen yang rendah (Blumberg 1997). Lebih kurang 250 juta penduduk dunia dijangkiti oleh HBV secara kronik (kebanyakan daripada mereka tinggal di Asia dan Afrika yang merangkumi lebih kurang 5% daripada penduduk dunia) (Ganem 1996). Di Eropah dan Amerika Utara, didapati insidens untuk pembawa yang dikenal-pasti adalah 1 dalam 1000 orang (Ganem 1996). Biasanya, hampir 25-40% akan mati akibat sirosis hepar atau karsinoma hepatoselular primer (Ganem 1996). Virus disebarkan melalui hubungan seksual, cecair badan, biasanya melalui darah (penyalah-gunaan suntikan dadah secara intra-vena, tatoo badan, pemindahan darah, pekerja yang terdedah kepada darah yang dijangkiti) dan melalui penyebaran dari ibu (pembawa virus)

kepada anak (Ganem 1996). Telah diketahui bahawa 1 ml darah daripada pembawa HBV mengandungi lebih kurang 10 bilion partikel virus yang boleh berjangkit, dan virus tersebut masih lagi boleh berjangkit selepas kering di atas sesuatu permukaan selama seminggu. Kesannya, risiko untuk mendapatkan HBV melalui jarum suntikan adalah lebih tinggi berbanding dengan HIV (Ganem 1996).

Di Malaysia, kajian mengenai kehadiran HBsAg di dalam darah mula dijalankan pada tahun 70an (Ton et al. 1979). Golongan yang dipilih untuk kajian prevalens HBsAg adalah penderma darah. Ini adalah kerana hanya HBsAg sahaja yang dikesan untuk proses penyingkiran secara biasa di tabung darah Hospital Besar Kuala Lumpur. Pada masa itu didapati kadar pembawa adalah setinggi 15-20% (Pang 1987). Kajian oleh Ton et al. (1979, 1990, 1995) mendapati kadar pembawa HBsAg adalah di antara 2-5% bergantung kepada kumpulan etnik.

1.5 PATOGENESIS JANGKITAN HBV

Patogenisiti penyakit hepar yang disebabkan oleh HBV masih lagi menjadi isu hangat. Sel hepatosit yang diinfeksi tidak menunjukkan kesan sitopatik viral yang jelas, jadi kerosakan hepar kemungkinannya adalah imunopatik, terutamanya melalui tindakan sel-T sitotoksik (CTL) CD8 positif. Epitop-epitop CTL kemungkinannya dijumpai pada HBcAg dan atau pada HBeAg, iaitu protein dalaman yang menjadi sasaran bagi sistem imun selular (Carman dan Thomas 1991). Produksi gen permukaan (HBsAg) tidak dianggap sebagai sasaran utama dan peranan protein HBV lain seperti antigen x dan polimerase masih lagi dalam kajian. Walaupun antibodi-antibodi terhadap kesemua protein HBV telah dijumpai, namun tidak ada bukti menunjukkan adanya

kesemua protein HBV telah dijumpai, namun tidak ada bukti menunjukkan adanya kesan sitotoksiti sel bergantung antibodi (antibodi dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC). Bagaimanapun, HBeAg telah diekspresikan pada permukaan sel yang ditransfeksikan dengan HBV-vaksin, menjadikannya sebagai sasaran untuk tindakan lisis sel oleh humoral (humoral mediated cell lysis), (Carman dan Thomas 1991).

Infeksi oleh HBV boleh mengakibatkan infeksi asimptomatik dan penyembuhan sepenuhnya, penyembuhan selepas hepatitis akut atau kronik, kematian daripada kegagalan fulminan hepar, sirosis ataupun karsinoma hepatosetular. Patogenesis oleh corak penyakit yang berbeza-beza ini kemungkinan mempunyai hubungan dengan respons imun yang bervariasi terhadap sel yang diinfeksi virus. Walau bagaimanapun, kesan oleh virus secara per se masih belum dikaji sepenuhnya dan mungkin variasi pada genom virus memainkan peranan penting dalam mengubahsuai patogenesis yang berlaku akibat infeksi tersebut (Carman dan Thomas 1991). Boleh dikatakan bahawa patogenesis jangkitan HBV masih lagi belum dapat ditentukan dengan jelas. Berdasarkan tanda-tanda yang terdapat pada pesakit, jangkitan HBV ini dibahagikan kepada dua iaitu jangkitan akut dan jangkitan kronik.

1.5.1 Jangkitan akut

Jangkitan akut HBV adalah berbeza-beza, di mana kebanyakan pesakit tidak menunjukkan tanda klinikal penyakit dengan jelas. Hepatitis yang dapat dipastikan secara klinikal dan jaundis wujud dalam 20-35% kes, dan penyakit ini kurang teruk pada kanak-kanak dan juga jika dos jangkitan adalah rendah. Hepatitis fulminan

jarang berlaku dan jika ianya terjadi, penyakit adalah sangat teruk dan boleh membawa kematian (Ganem 1996).

Biasanya, jangkitan akut mempunyai tempoh inkubasi yang panjang (45-120 hari selepas permulaan jangkitan. Dalam tempoh ini, replikasi virus adalah sangat tinggi ($>10^{10}$ partikel/ml). Pada akhir tempoh inkubasi, berlaku satu fasa prodromal yang pendek; (tanda-tandanya adalah seperti penyakit yang disebabkan oleh selsema, demam, fatig dan malaise). Seterusnya diikuti oleh fasa ikterik (seperti jaundis, kekuningan pada membran mukosa, kulit dan konjunktiva). Fasa ini mungkin berterusan selama 4-8 minggu dan diikuti oleh tempoh konvalesen (Ganem 1996).

1.5.2 Jangkitan kronik

Jangkitan kronik aktif berlaku dalam lebih kurang 2-10% pesakit yang dijangkiti oleh HBV, dan kebanyakannya berlaku pada bayi (80-90% daripada neonatal yang terdedah kepada jangkitan akan mengakibatkan jangkitan kronik). Kebanyakan pesakit kronik HBV adalah asimptomatik untuk beberapa tahun, walaupun terdapatnya tanda kerosakan hepar (peningkatan enzim fungsi hepar di dalam darah). Biasanya penyakit akan mengambil masa yang lama untuk dimanifestasikan. Jika penyakit tersebut berkembang) dan boleh menyebabkan sirosis atau karsinoma hepatoselular (Ganem 1996; Blumberg 1997).

Pembawa HBV akan terus menghasilkan partikel virus yang tinggi dan HBsAg di dalam darah, semen dan saliva untuk jangka masa yang panjang. Punca yang boleh menyebabkan jangkitan menjadi akut atau kronik masih belum dapat dipastikan. Ini

adalah salah satu sebab kenapa penyelidikan berkenaan HBV masih lagi dijalankan walaupun vaksin terhadapnya sudah ditemui sejak dulu lagi. Bukti-bukti yang ada mencadangkan patogenesis jangkitan HBV adalah berkaitan dengan keberkesanan sistem imun selular terutamanya repons sel limfosit-T sitotoksik (CTL). Kehadiran CTL yang rendah di dalam darah pembawa HBV menunjukkan kekurangan sel tersebut adalah faktor predispos kepada jangkitan kronik (Ganem 1996).

1.6 DINAMIK VIRAL DALAM JANGKITAN HBV

Kebelakangan ini, viral dinamik oleh jangkitan HBV dalam pesakit HBV kronik telah dikaji (Nowak et al. 1996). Kajian tersebut menunjukkan terdapat lebih kurang 1011 partikel virus yang dibebaskan ke dalam sistem periferi (iaitu darah) setiap hari dan separuh hayat bagi sel yang dijangkiti oleh HBV adalah antara 10-100 hari. Paras penghasilan virus yang tinggi ini adalah 100 kali ganda lebih berbanding dengan kes HIV-1 (mungkin juga disebabkan separuh hayat bagi sel yang dijangkiti HBV adalah 10-100 kali lebih lama berbanding separuh hayat sel yang dijangkiti HIV) (Ganem 1996).

Dalam jangkitan kronik HBV, secara putaranya, terdapat di antara 5% hingga 40% daripada semua sel hepatosit boleh dijangkiti dan menghasilkan partikel virus (hepar mengandungi kira-kira 2×10^{11} hepatosit). Secara kasarnya, 1-10% daripada yang dijangkiti akan mati setiap hari, dan ini bermakna badan kita terpaksa menghasilkan lebih kurang 109 hepatosit baru setiap hari untuk menggantikan sel-sel yang dimusnahkan oleh virus tersebut (Ganem 1996).

1.7 VIRUS HEPATITIS B

Partikel virus hepatitis B mula-mula sekali dilihat oleh David Dane pada tahun 1970 (Dane et al. 1970). Oleh sebab itu HBV juga dikenali sebagai zarah Dane. Selepas itu lebih banyak lagi penanda lain yang berkaitan dengan HBV ditemui. Almeida et al. (1971) misalnya telah menemui kor atau nukleokapsid HBV (HBeAg) manakala Magnius dan Espmark (1972) telah menghuraikan tentang cara replikasi virus tersebut. DNA genom HBV yang berbentuk bebenang duaan (dsDNA) telah dikenalpasti pada tahun 1974. Pada tahun 1975, HBeAg iaitu antigen yang dihubungkan dengan darjah infektiviti HBV ditemui oleh Lars Magnius (Magnius et al. 1975). William Robinson dan rakan-rakan pula berjaya mengenalpasti DNA polimerase di dalam virus ini (Robinson dan Lutwick 1976) dan mengesan kehadiran protein kinase berganding virion (Albin dan Robinson 1980). Genom HBV juga diklonkan (Burrell et al. 1979) dan vaksin terhadap jangkitan virus ini dihasilkan dengan berkesan (Tilzey et al. 1988).

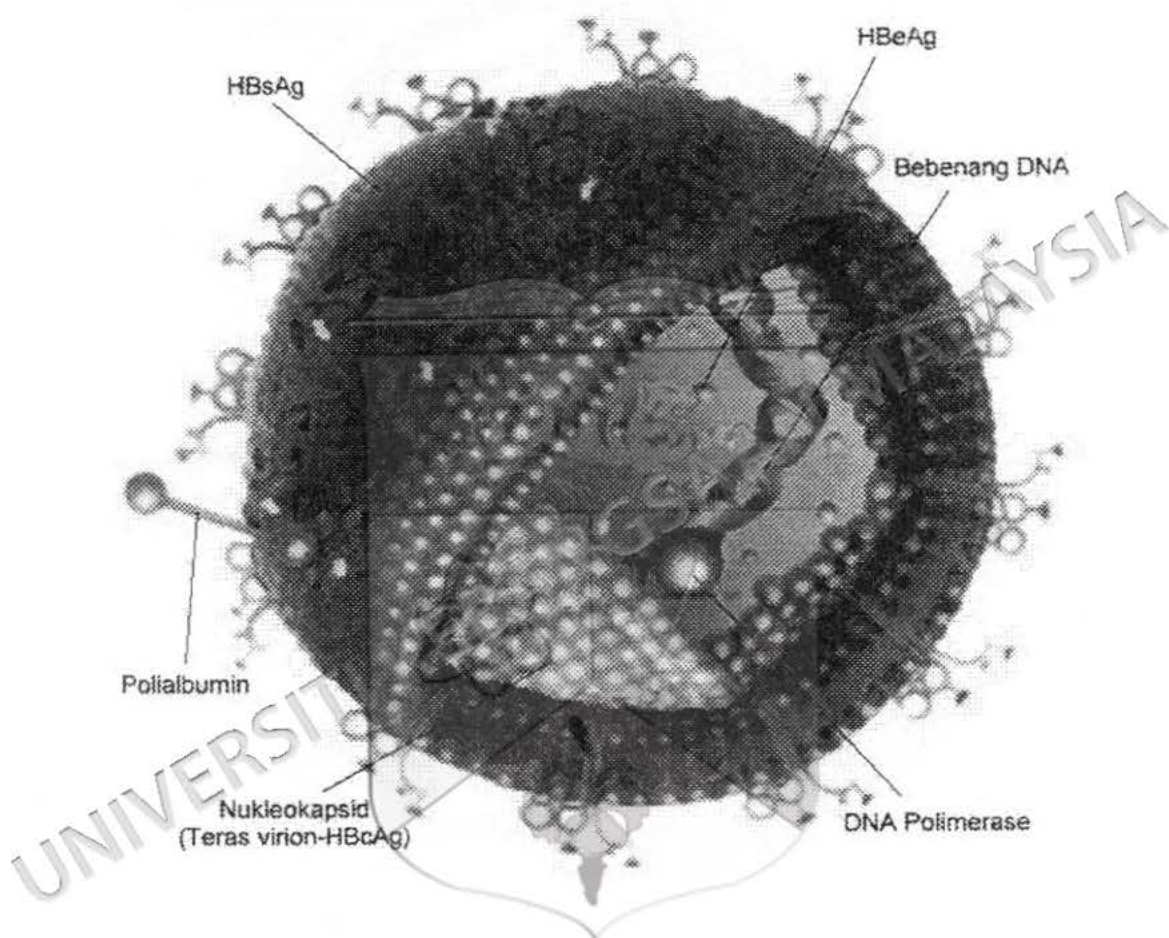
HBV yang dikelaskan di dalam famili hepadnavirus (virus hepatropik DNA) hanya menjangkiti manusia dan chimpanzee sahaja (Kumar et al. 1992). Virus daripada famili ini mempunyai beberapa ciri-ciri yang hampir sama seperti organisasi gen/genom dan juga cara bereplikasi. Ia juga mempunyai kaitan filogenetik dengan virus daripada famili lain seperti virus Cauliflower mosaic dan retrovirus, di mana ciri enzim transkriptase berbalik dan beberapa ciri lain adalah sama. Lain-lain hepadnavirus yang tidak menjangkiti manusia adalah seperti virus hepatitis Woodchuck (Woodchuck Hepatitis Virus, WHV), GSHV (Ground Squirrel Hepatitis Virus, iaitu hepatitis yang terdapat dari tupai jenis *Spermophilus beecheyi* dan

Marmota monax) serta DHBV (Duck Hepatitis B Virus, virus yang menjangkiti itik Pekin, *Anas domesticus*) (Ton 1989; Ganem 1996).

HBV lengkap (zarah Dane) yang berukuran 42nm (Dane et al. 1970) mempunyai tiga jenis antigen iaitu antigen permukaan (HBsAg), antigen kor (HBcAg) dan antigen e (HBeAg) serta protein bukan struktur seperti DNA polimerase, protein HBxAg dan protein kinase (Rajah 1.1). Bahagian luar zarah Dane terdiri daripada protein-protein yang secara kolektifnya dikenali sebagai HBs atau protein permukaan. Bahagian luar ini akan menyaluti satu lagi lapisan protein yang terdiri daripada protein-protein HBc. Protein bahagian dalam ini dirujuk sebagai partikel teras (kor) atau kapsid (nukleokapsid). Partikel teras ini pula akan menyelubungi DNA virus dan enzim DNA Polimerase (Rajah 1.2).

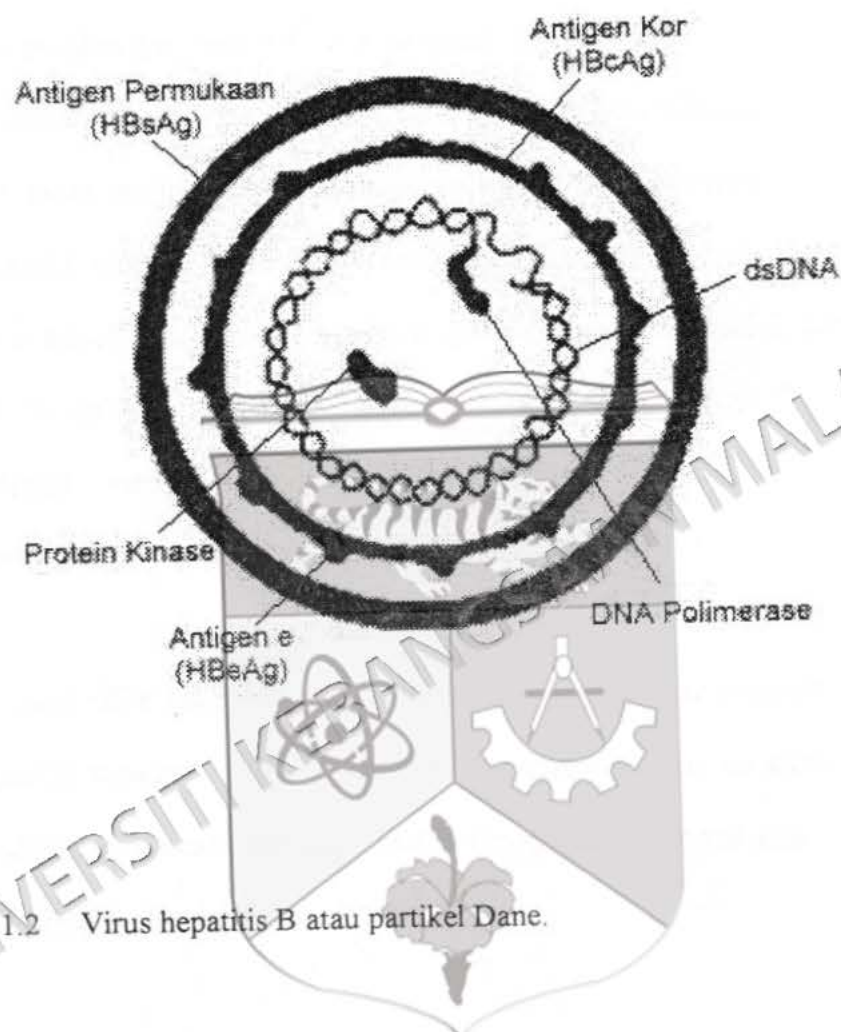
1.8 HBV-DNA

DNA HBV adalah berbentuk lingkaran bebenang duaan (dsDNA) yang berbeza panjangnya (Robinson et al. 1974). Bebenang yang lebih panjang mempunyai satu 'nick' pada suatu kedudukan tetap. Bebenang panjang iaitu bebenang L (-) terdiri daripada 3200 nukleotid dan ia mengandungi gen untuk sintesis semua protein virus. Bebenang pendek iaitu bebenang S (+) adalah 50%-70% daripada panjang bebenang L (Summers et al. 1975) terdiri daripada 1700-2800 nukleotid. Terdapat satu DNA polimerase yang terikat di terminal 5' pada bebenang L melalui ikatan kovalen (Ton 1989).



RAJAH 1.1 Ilustrasi Zarah Hepatitis B Virus.

Sumber: Poster Wellcome Inc. 1988.



RAJAH 1.2 Virus hepatitis B atau partikel Dane.

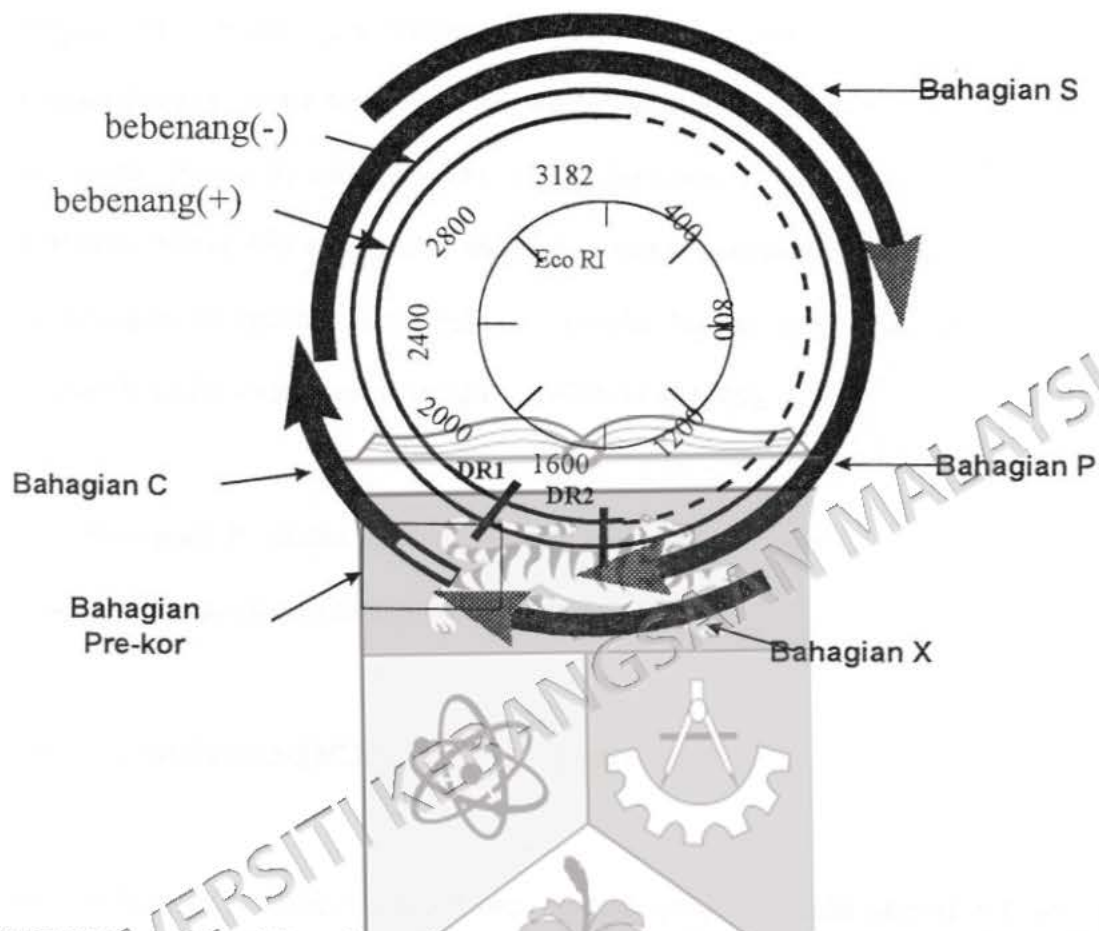
Sumber: Diubahsuai dari Galasso et al. (1990)

1.9 ORGANISASI GENOM HBV

Genom HBV mempunyai organisasi yang kecil dan padat sehingga ada beberapa tempat pengkodan dan translasi yang bertindih (Ganem 1996). Ini adalah cara yang berkesan untuk genom yang bersaiz kecil menambahkan bilangan asid amino yang dihasilkan. Ianya terdiri daripada (sebahagiannya) bebenang berganda DNA (dsDNA) yang berbentuk bulatan. Bebenang (-) iaitu bebenang yang berpadanan dengan mRNA mempunyai saiz 3.2kb, manakala bebenang (+) adalah lebih pendek dan mempunyai saiz yang bervariasi (1.8 hingga 2.7 kb) (Ganem 1996). Genom HBV mempunyai empat rangka pembacaan terbuka (Open Reading Frames, ORF) yang utama. Keempat-empat rangka itu berada pada bebenang panjang (Miller et al. 1989).

Genom HBV boleh dibahagi kepada beberapa bahagian (region) iaitu bahagian S, bahagian P, bahagian X dan bahagian C. Bahagian-bahagian ini adalah berdasarkan kepada rangka pembacaan terbuka. Jujukan (sequence) nukleotid adalah berbeza-beza mengikut subjenis virus berkenaan (Rajah 1.3).

Gen S mengandungi tiga kodon pemula translasi (ATG), setiap satu terdapat pada permulaan bahagian pre-S1, pre-S2 serta bahagian S dan mempunyai satu kodon penamat (TAG/TAA) pada bahagian hujung gen. Bahagian S (surface) adalah gen yang mengkodkan sintesis polipeptid yang berkaitan dengan HBsAg. Bahagian pre-S (pre-surface) pula mengkodkan sintesis di permukaan zarah Dane. Beza antara bahagian S dan bahagian pre-S adalah dari segi strukturnya (Ton 1989).



RAJAH 1.3 Perwakilan skematik genom HBV seperti yang terdapat pada partikel virus. Kedudukan bacaan jujukan nukleotid bermula daripada tapak EcoRI. Origin sintesis bebenang - (panjang) adalah pada direct repeat 1 (DR1), manakala origin sintesis bebenang + (pendek) adalah pada direct repeat 2 (DR2).

Sumber: diubahsuai daripada Carman & Thomas 1991.

Bahagian kor (core) atau dikenali juga dengan nama bahagian C mengkodkan sintesis polipeptid nukleokapsid protein HBcAg yang terdiri daripada 183 asid amino. Bahagian pre-kor/kor (pre-core/core) terlibat dalam sintesis HBeAg manakala bahagian pre-kor sahaja terlibat dalam sintesis peptid isyarat yang mengandungi 19 asid amino. Bahagian ini (pre-kor) terdiri daripada 87 pasangan bes (nukleotid 1814/1816-1990/1992) tetapi tidak diperlukan untuk penghasilan zarah virus. Kedua-dua bahagian ini terletak pada bahagian rangka bacaan yang sama tetapi mereka mempunyai kodon inisiasi yang berlainan (Miller et al. 1989).

Bahagian P adalah bahagian yang mengkodkan sintesis enzim polimerase manakala bahagian X pula mengkodkan sintesis HBxAg.

1.10 ANTIGEN-ANTIGEN DAN PENANDA HBV

HBV mempunyai beberapa antigen dan penanda yang disintesis semasa reproduksi virus oleh bahagian-bahagian tertentu genom. Setengah-setengah daripada komponen ini akan memasuki aliran darah dan menyebabkan perubahan-perubahan yang boleh dikesan, manakala setengah-setengah yang lain hanya boleh ditentukan melalui biopsi hepar, dan selainnya memerlukan ujian-ujian yang canggih dan berkesan untuk menentukannya (Kumar et al. 1992; Ganem 1996).

1.10.1 Antigen permukaan (HBsAg)

Antigen permukaan yang ditemui oleh Blumberg et al (1965) juga dikenali sebagai Antigen Australia (Kumar et al. 1992). HBsAg boleh didapati dengan jumlah yang

banyak di dalam darah pesakit yang terinfeksi. Bentuk yang biasa dijumpai adalah partikel sfera heterogenous berdiameter antara 16-25nm dan juga bentuk filamen yang mempunyai lebar 22nm dan panjang sehingga beberapa ratus nm (Bayer et al. 1968). Ini berbeza daripada zarah HBV yang berbentuk lingkaran dengan diameter 42nm dan mempunyai komponen kor dalam (Ton 1989). HBsAg yang berbentuk filamen ini juga dijumpai di dalam darah meskipun hubungan filamen ini dengan zarah 22nm dan zarah 42nm tidak mempunyai perbezaan yang jelas buat masa ini (Ton 1989).

Komposisi utama HBsAg ini adalah terdiri daripada protein, karbohidrat dan lipid. Gen S mengkodkan sintesis polipeptid yang berkaitan dengan HBsAg. Protein-protein yang dihasilkan oleh kedua-dua gen pre-S1 dan pre-S2 mempunyai reseptor terhadap albumin serum manusia berpolimeran. Oleh kerana hepatosit manusia juga mempunyai reseptor terhadap albumin ini maka virus dapat masuk ke dalam hepatosit (Hollinger & Dreesman 1979).

Protein HBsAg kaya dengan triptofan dan asid amino hidrofobik terutama leusin. HBsAg yang tulen adalah sangat stabil apabila bertindak dengan urea, natrium dodesil sulfat (SDS) dan beberapa enzim proteolitik. Ia juga stabil pada beberapa pH asid. Penurunan ikatan disulfidnya mengakibatkan kehilangan kesempurnaan aktiviti (Ton 1989). Zarah HBsAg mempunyai satu kumpulan antigen spesifik a dan umumnya kumpulan antigen ini mengandungi dua sub-determinan d atau y dan w atau r (Le Bouvier 1973). Oleh yang demikian subjenis HBsAg boleh dibahagikan kepada beberapa bentuk iaitu adw, adr, ayw dan ayr. Biasanya sub-determinan ini tidak memainkan peranan dari segi diagnosis penyakit. Ini adalah kerana jangkitan

yang disebabkan oleh satu subjenis determinan memberikan perlindungan terhadap jangkitan yang disebabkan oleh subjenis HBV yang berlainan (Ton 1989).

1.10.2 Antigen Kor (HBeAg)

HBeAg adalah protein pada nukleokapsid HBV. Biasanya protein-protein HBc akan bergabung antara satu sama lain membentuk kapsul yang mengandungi HBV-DNA dan DNA Polimerase. Protein HBc ini tidak dapat dikesan di dalam aliran darah, walau bagaimanapun, ia dapat diperolehi daripada sel hepar yang diambil daripada biopsi hepar. Pengeluaran antigen permukaan (HBsAg) dengan detergen bukan ionik seperti Triton-100 atau Nonidat P40 mengakibatkan pembebasan antigen kor. Antigen kor serum mempunyai dua titik isoelektrik iaitu pada pH 4.40 dan 4.86 berturut-turut secara menggunakan teknik fokus isoelektrik. Ini menunjukkan bahawa antigen kor wujud dalam beberapa bentuk atau konformasi. Keputusan yang sama didapati daripada kor yang diperolehi daripada serum samada yang mengandungi antigen e atau tidak (Ton 1989).

Pusat virion dan partikel HBeAg yang diperolehi daripada hepar yang diinfeksi atau zarah kor yang sempurna mempunyai aktiviti protein kinase. Peranan enzim ini di dalam proses infeksi dan replikasi virus tidak jelas (Albin & Robinson 1980).

1.10.3 Antigen e (HBeAg)

HBeAg adalah hasil translasi daripada jujukan ATG yang pertama bahagian gen pre-kor/kor (Carman dan Thomas 1991). Antigen e adalah protein larut air dan

pengesananannya dikaitkan dengan fasa jangkitan HBV (Magnius dan Espmark 1972). Sembilan belas asid amino pertama yang dihasilkan daripada bahagian pre-kor merupakan peptid isyarat yang membolehkan HBeAg disekresi melalui sistem membran intrasel (Carman dan Thomas 1991). Peptid isyarat ini bertindak dengan mengikat pada reseptor yang terdapat di atas retikulum endoplasmik: dengan proses translasi yang berterusan, translokasi kepada membran berlaku. Apabila isyarat peptid ini terpisah, terminal karboksil dengan panjang yang berbeza-beza dibuang dan protein (HBeAg) dirembeskan (Carman dan Thomas 1991).

Kehadiran HBeAg di dalam serum berkait rapat dengan HBcAg dan aktiviti DNA polimerase kerana kedua-dua penanda ini adalah penanda antigen dan biokimia pada zarah HBV. HBeAg pada umumnya boleh digunakan sebagai penanda untuk jangkitan tinggi didalam kedua-dua transmisi horizontal dan transmisi ibu-fetus. Kehadiran HBeAg dalam serum pesakit hepatitis kronik boleh menyebabkan prognosis yang teruk. Biasaya serum yang positif terhadap HBsAg mengandungi HBeAg atau anti-HBe. HBeAg apabila terikat kepada IgG boleh menyebabkan glomerulonefritis membran pada pesakit terutama kanak-kanak (Ton 1989).

1.10.4 Antigen x (HBxAg)

HBxAg adalah protein pelaksana proses transkripsi yang mengandungi 145 hingga 154 asid amino, bergantung kepada subjenis. Protein X yang dihasilkan oleh gen X ini berfungsi sebagai protease serin (Carman dan Thomas 1991). Ianya adalah protein pengawal-atu yang bertindak sebagai pengaktif-*trans* virus (*trans*-activator) untuk mengaktifkan beberapa gen daripada manusia dan virus serta merangsang proliferasi sel

(Kidd-Ljunggren et al. 1995; Runkel et al. 1993). Dipercayai HBxAg memainkan peranan penting dalam pembentukan hepatoma (Koike 1995) dan ianya adalah antigenik terhadap sistem imun selular (Jung et al. 1990).

1.10.5 Hepatitis B DNA (HBV DNA)

HBV-DNA adalah penanda yang pertama sekali dapat dikesan di dalam aliran darah selepas bermulanya jangkitan. Ianya boleh dikesan seawal satu minggu selepas jangkitan dengan menggunakan ujian yang sensitif. Pengukuran paras HBV-DNA ini penting untuk menunjukkan kadar replikasi virus. Walau bagaimanapun, ujian ini tidak dijalankan secara rutin dan biasanya digunakan sebagai penunjuk kepada keadaan penyakit, kesesuaian untuk rawatan (interferon) atau pun untuk tujuan penyelidikan (Gallasio et al. 1990).

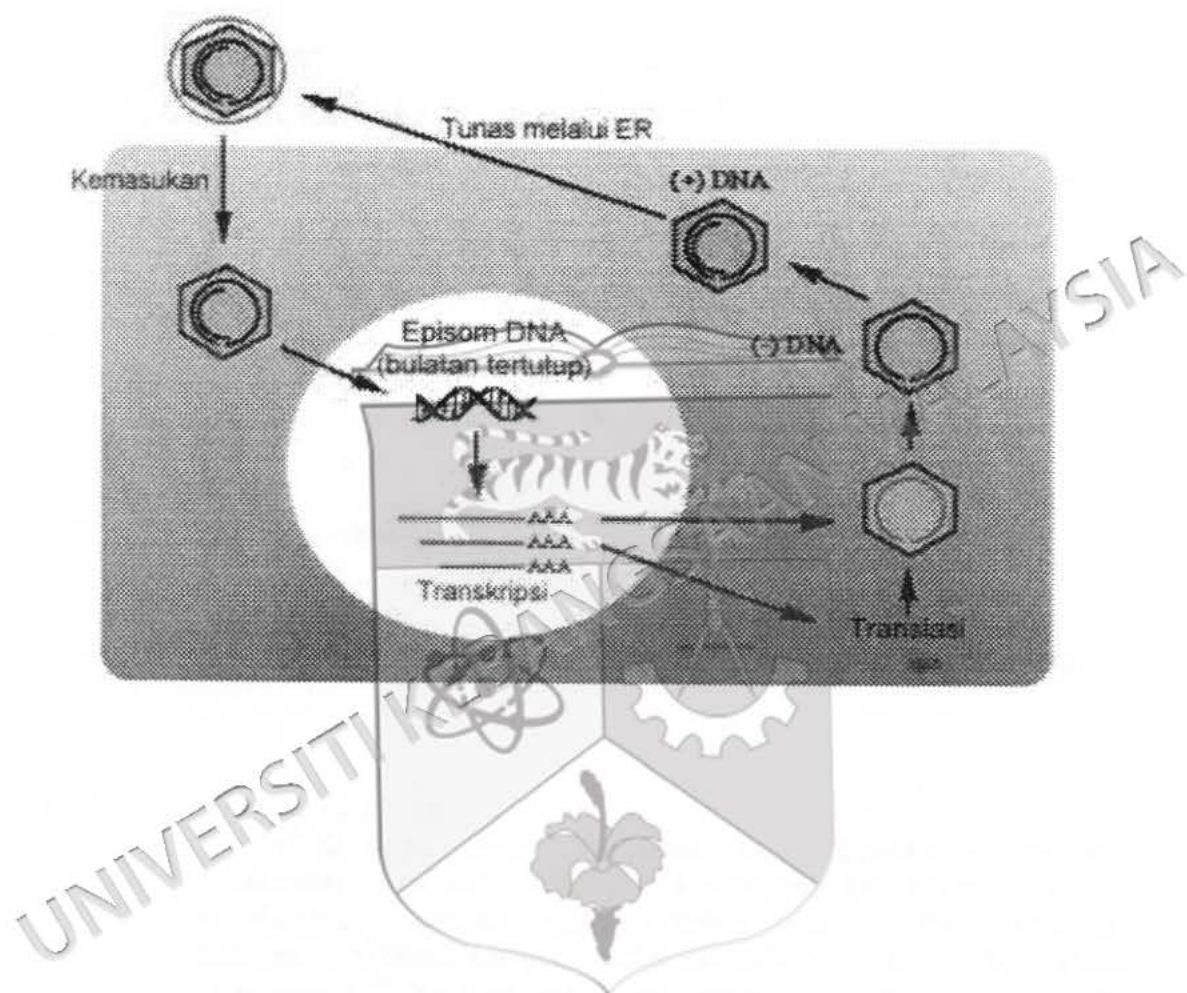
1.10.6 DNA Polimerase Hepatitis B (HBV DNA Polymerase)

Enzim ini dapat dikesan kehadirannya di dalam aliran darah sebaik sahaja bermulanya jangkitan hepatitis B iaitu pada masa yang hampir sama dengan HBV DNA (satu minggu selepas jangkitan). Ujian untuk HBV DNA polimerase juga tidak dijalankan secara rutin dan hanya digunakan sebagai penunjuk kepada progresi penyakit, kesesuaian untuk rawatan dan untuk tujuan penyelidikan (Ganem 1996).

1.11 KITAR REPLIKASI HBV

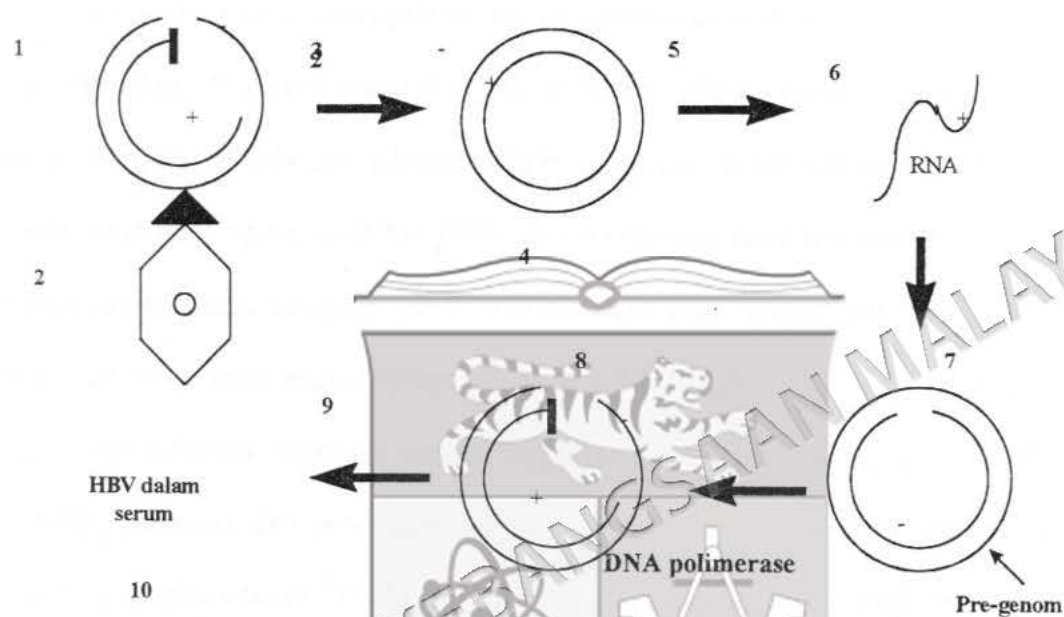
Kitar replikasi HBV (Rajah 1.4) adalah berbeza daripada replikasi virus DNA lain tetapi menyerupai kitar replikasi retrovirus (virus RNA). Perbezaan yang ketara pada kitar replikasi ialah adanya satu bahantara pregenom RNA. Sebelum HBV masuk kedalam sel perumah, permukaan luar HBV akan terikat dengan polialbumin di dalam darah. Kemudian kompleks ini akan mengikat dengan reseptor polialbumin pada permukaan membran hepatosit. Selepas HBV masuk ke dalam sel perumah, partikel teras virus akan di tanslokasi ke dalam nukleus sel. DNA virus ini akan 'diperbaiki' dan berkembang menjadi DNA bulat kovalen tertutup (covalently closed circular DNA, cccDNA) (Ganem 1996) di mana bebenang pendek (+) yang tidak sempurna berubah menjadi sempurna melalui tindakan DNA polimerase endogen. cccDNA boleh dianggap sebagai analog kepada DNA pro-virus yang dibentuk oleh retrovirus (Ganem 1996).

cccDNA ini berfungsi sebagai templat bagi RNA polimerase II sel perumah untuk mensintesis pregenom RNA (pgRNA) di mana sintesis pregenom RNA bermula dengan menggunakan bebenang (-) sebagai template. Seterusnya pregenom RNA (+) ini menjadi templat untuk sintesis bebenang (+) DNA melalui enzim transkriptase berbalik. DNA yang baru disintesis mempunyai kira-kira 300 nukleotid mungkin menjadi primer bagi sintesis bebenang (-) pada peringkat awal. Pemanjangan bebenang (-) diikuti oleh pemecahan pregenom RNA. Sintesis bebenang (+) hanya bermula selepas sintesis bebenang (-) siap. Pembungkusan virus bermula sebelum pemanjangan sempurna berlaku ke atas bebenang (+). Oleh itu terdapat bebenang (+) yang tidak sempurna di dalam genom HBV (Rajah 1.5) (Ton 1989).



RAJAH 1.4 Kitar hidup virus hepatitis B
ER: Endoplasmik Retikulum

Sumber: Diubahsuai dari Ganem (1996).



RAJAH 1.5 Proses replikasi HBV.

1=HBV di dalam serum. 2=Terikat pada polibumin dan reseptor polialbumin hepatosit. 3=Selepas kemasukan ke dalam hepatosit. 4=Bebenang(+) menjadi sempurna melalui tindakan DNA polimerase endogen. 5=Transkripsi pre-genom daripada bebenang(-). 6=(+)RNA (pre-genom). 7=Pembungkusan pre-genom, DNA polimerase dan kor. 8=Sintesis DNA bebenang(-) dan pemecahan pre-genom. 9=Sintesis bebenang(+). 10=Eksport.

Sumber: Ton (1989).

1.12 PROFIL SERODIAGNOSIS TERHADAP PENANDA HBV

Kebelakangan ini HBV telah diselidiki secara meluas dari segi biologi, imunokimia, ujian klinikal dan sebagainya. Teknik-teknik tertentu seperti radio imunoasai (RIA), enzimimunoasai (EIA), mikropartikel enzim imunoasai (MEIA) dan beberapa teknik lain digunakan di dalam makmal untuk mengkaji HBV. Teknik-teknik ini penting untuk mempelajari beberapa penanda HBV dalam serum dan penanda HBV terhadap sistem imun pada masa jangkitan HBV dalam beberapa jenis keadaan klinikal. Kajian menunjukkan setiap penanda HBV mencetuskan satu episod peristiwa virus atau respon perumah pada masa tertentu replikasi HBV. Oleh itu profil terhadap penanda HBV pada beberapa peringkat semasa jangkitan klinikal boleh memberikan maklumat terhadap diagnosis dan prognosis penyakit hepatitis B. Kajian yang dilakukan oleh Overby dan rakan-rakan (1981) menunjukkan terdapatnya corak bagi penanda HBV yang dijumpai didalam serum beberapa jangkitan HBV (Ton 1989).

Secara umumnya, tempoh inkubasi bagi HBV adalah di antara 6-25 minggu. HBsAg biasanya dikesan di antara tempoh mula jangkitan dan satu ke enam minggu sebelum simptom dapat dilihat. Buat masa ini ujian pengesanan terhadap kehadiran HBsAg merupakan ujian piawai untuk menunjukkan pesakit dijangkiti oleh HBV. Jika HBsAg hadir selepas lebih daripada enam bulan, ia dianggap sebagai jangkitan kronik (Ganem 1996).

1.12.1 Penanda HBV dalam jangkitan akut dan kronik

Penanda serologi yang biasanya dijumpai di dalam serum semasa jangkitan HBV mengikut urutan ialah HBsAg, HBeAg dan anti-HBs. HBsAg boleh dikesan di dalam darah pesakit dua hingga lapan minggu sebelum simptom hepatitis dimanifestasikan dan ia berlanjutan semasa fasa akut (Gray dan Wreghitt 1992). Antigen ini dihapuskan daripada darah semasa fasa penyembuhan apabila antibodi terhadap HBsAg (anti-HBs) dihasilkan (Edwards 1988). Tetapi HBsAg biasanya sudah hilang apabila anti-HBe hadir dalam darah pesakit. Keadaan ini adalah benar dalam semua kes jangkitan HBV akut yang terhad sendiri (Ton 1989). Sebaik sahaja HBsAg dapat dikesan, virion yang lengkap dan HBeAg juga muncul di dalam darah (Kumar et al. 1992). Anti-HBs boleh dilihat di dalam serum beberapa minggu hingga beberapa bulan selepas kehilangan HBsAg. Kelewatan ini dirujuk sebagai fasa tingkap (Ton 1989). Dalam tempoh masa tersebut, kehadiran anti-HBc merupakan satu-satunya penanda bagi jangkitan HBV (Kumar et al. 1992). Jika HBsAg gagal dihapuskan dalam masa enam bulan, ini menunjukkan keadaan pembawa kronik HBsAg (Edwards 1988).

HBeAg tidak dapat dikesan di dalam serum sepanjang jangkitan HBV, tetapi komponennya iaitu HBeAg boleh didapati beberapa hari selepas kehadiran HBsAg. HBeAg dihapuskan daripada serum dalam tempoh enam minggu pada jangkitan akut, biasanya berlaku antara 2-3 minggu sebelum kehilangan HBsAg (Kumar et al. 1992). Tetapi seperti HBsAg, ia boleh berterusan di dalam keadaan pembawa (Edwards 1988). Selain daripada itu, kehadiran HBeAg ini juga menunjukkan hubungan dengan HBV-DNA dan DNA polimerase yang dikesan di dalam darah (Edwards 1988). Kehadiran kedua-dua penanda ini menunjukkan replikasi virus berlaku dengan aktif

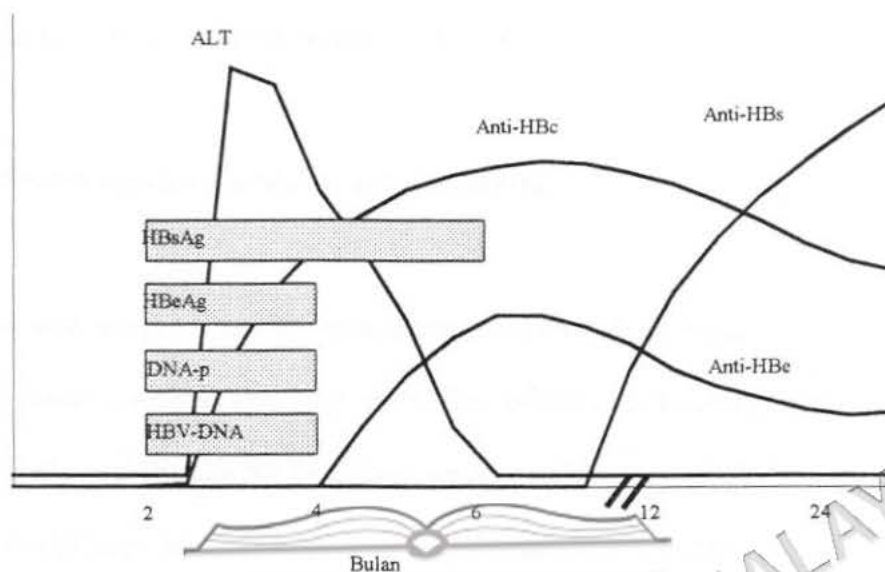
dan keadaan viremia. Oleh sebab itu kehadiran bahan-bahan biokimia ini biasanya dijadikan pananda dalam jangkitan kronik.

Kehadiran antibodi terhadap HBcAg (anti-HBc) menunjukkan permulaan tindakbalas keimunan terhadap jangkitan HBV (Mondelli et al. 1988). Anti-HBc boleh hadir berterusan di dalam darah sepanjang hayat. Walau bagaimanapun kehadiran anti-HBc tidak menandakan berakhirnya replikasi virus yang aktif dan berjangkit. Ini adalah kerana anti-HBc tidak meneutralkan virus dan hanya bertindak pada sebahagian komponen virus sahaja (Edwards 1988).

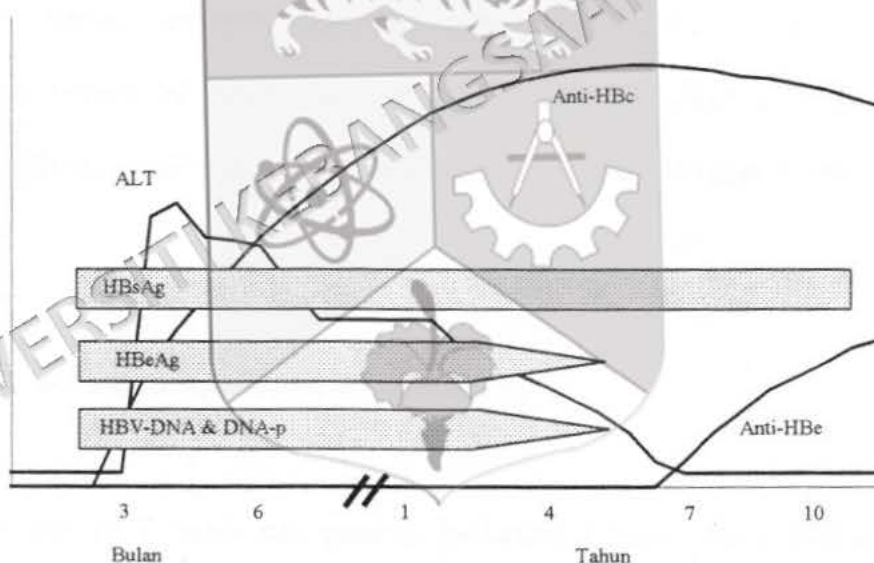
Antibodi terhadap HBeAg (anti-HBe) pula dapat dikesan selepas kehadiran anti-HBc. Seperti anti-HBc, anti-HBe adalah antibodi yang tidak meneutralkan tetapi kehadirannya di dalam darah menunjukkan penurunan replikasi virus dan berlakunya resolusi pada fungsi hepar yang tidak normal dalam jangkitan akut terhad sendiri. Dalam keadaan tertentu dimana HBV mengalami mutasi kodon penamat pada bahagian pre-kor genom HBV, HBeAg tidak dapat dikesan di dalam darah pesakit. Mutan ini dikaitkan dengan jangkitan kronik HBV yang positif terhadap anti-HBe (Carman dan Thomas 1991; Chuang et al. 1993).

Antibodi yang meneutralkan virus ialah anti-HBs. Kehadirannya menunjukkan fasa penyembuhan dan ia melindungi perumah daripada jangkitan semula (Mondelli et al. 1988). Perbandingan pengekspresan antigen dan antibodi sebagai penanda-penanda jangkitan kronik dan akut ditunjukkan dalam Rajah 1.6. Pada umumnya, kehadiran HBsAg dan HBeAg di dalam serum berulang-ulang disesuaikan dengan

a. Jangkitan Akut



b. Jangkitan Kronik



RAJAH 1.6 Penanda-penanda yang dapat dikesan di dalam darah pesakit daripada jangkitan akut dan kronik HBV.

HBsAg=Antigen s, HBeAg=Antigen e, HBV-DNA=DNA hepatitis B, ALT=Alanin transaminase, DNA-P=DNA polimerase, Anti-HBc=Antibodi terhadap antigen c, Anti-HBe=Antibodi terhadap antigen e, Anti-HBs=Antibodi terhadap antigen s.

Sumber: Galasso et al. (1990).

penyakit hepar kronik. Akan tetapi kehadiran HBsAg dan anti-HBe disesuaikan dengan keadaan pembawa asimptomatik (Ton 1989).

1.12.2 Pembawa senyap (pembawa asimptomatik)

Dalam pembawa senyap, pesakit mengalami satu keadaan asimptomatik terhadap HBsAg antigenemia selepas jangkitan HBV. Ini diikuti oleh kehilangan HBsAg. Pada masa ini HBeAg boleh dikesan di dalam serum apabila terdapat kehadiran HBsAg. Beberapa pesakit juga menunjukkan fasa tingkap sebelum anti-HBs dikesan di dalam serum. Anti-HBs tidak dapat dikesan di dalam serum selama beberapa tahun. Pada pesakit ini hanya terdapat anti-HBe yang menunjukkan kehadiran HBV. Kemungkinan pesakit ini masih mengidapi jangkitan HBV sukar dipastikan kerana kepekatan HBsAg adalah sangat rendah hingga tidak boleh dikesan di dalam serum (Ton 1989).

1.13 HBV-DNA DALAM JANGKITAN HBV

Peningkatan aras ALT (salah satu penanda biokimia) didapati mempunyai hubungan dengan kehadiran HBV-DNA semasa jangkitan HBV. Peningkatan aras ALT yang berkait dengan perubahan struktur dan fungsi hepatosit serta hubungannya dengan HBV-DNA belum diketahui sepenuhnya tetapi didapati HBV-DNA serum telah mencapai aras maksimum pada sebelum atau semasa peningkatan maksimum ALT dalam lebih daripada 90% kes eksaserbasi (exacerbation) akut hepatitis B kronik (Liaw et al. 1988). Peningkatan HBV-DNA ini berlaku sebelum hepatolisis pada eksaserbasi akut.

Selain daripada itu, HBV-DNA juga mempunyai hubungan yang rapat dengan kehadiran HBeAg yang diikuti oleh peningkatan aras anti-HBe. Pengesanan HBeAg di dalam darah menunjukkan fasa replikasi jangkitan HBV dan kehadiran anti-HBe pula dianggap berlakunya pertukaran kepada fasa kejangkitan tak aktif akibat penghapusan HBeAg. Tetapi ada laporan (Carloni et al. 1987; Bernstam 1992) menyatakan bahawa replikasi HBV boleh berlaku dalam kehadiran anti-HBe. HBV-DNA telah didapati pada serum pembawa anti-HBe yang mengalami kerosakan hepar yang teruk tetapi tidak dijumpai pada pembawa anti-HBe yang mempunyai hepar normal atau kerosakan hepar minimum (Bonino et al. 1986).

Pengesanan kehadiran HBV-DNA dapat dilakukan dengan lebih tepat menggunakan teknik tindakbalas rantai polimerase (PCR). Sensitiviti pengesanan DNA virus menggunakan teknik PCR adalah jauh lebih tinggi berbanding dengan teknik-teknik lain (Shih et al. 1990). Dengan menggunakan PCR, DNA virus bukan sahaja dapat dikesan didalam pesakit kronik aktif yang negatif terhadap HBeAg (90%) malah ia juga dapat dikesan pada pembawa sihat yang negatif terhadap HBeAg (80%). Ini menunjukkan bahawa replikasi virus adalah paling aktif pada pembawa hepatitis B kronik aktif walaupun bertaku serokonversi (seroconversion) kepada status anti-HBe (Shih et al. 1990).

Dalam kes tertentu di mana berlaku mutasi pada genom HBV, pengekspresan penanda-penanda serologi tidak dapat diperhatikan (contohnya dalam mutasi kodon penamat bahagian pre-kor genom HBV). Di sini, penentuan jujukan nukleotid HBV-DNA perlu dilakukan jika ingin melakukan diagnosis yang lebih tepat.

1.14 HUBUNGAN MUTASI HBV DENGAN KETERUKAN HEPATITIS

Infeksi HBV boleh menyebabkan berbagai penyakit secara akut dan kronik kepada manusia (Ganem 1996; Blumberg 1997; Ogata et al. 1993). Pesakit kronik HBV boleh menjadi pembawa tanpa mengidap penyakit hepar iaitu pembawa asimptomatik (asymptomatic carrier, ACS) atau mempunyai aktiviti penyakit hepar kronik (Chronic Liver Disease, CLD) (Chuang et al. 1993). Perkembangan dalam bidang biologi molekul telah membawa kepada analisis jujukan nukleotid HBV (Chuang et al. 1993). Analisis ini banyak membantu dalam penafsiran klinikal penanda-penanda serologi terutamanya HBeAg dan anti-HBe (Cuthbert 1991).

Sekarang ini terdapat banyak penemuan mengenai mutasi-mutasi pada genom HBV yang terjadi secara semulajadi semasa jangkitan kronik virus (Scaglioni et al. 1997). Pada umumnya, mutasi telah dikenalpasti berlaku pada semua gen virus dan bahagian yang terlibat dengan pengawal-aturan, terutamanya pada gen yang mengkodkan struktur sampul dan protein nukleokapsid (Blum et al. 1997). Bahagian pada genom virus yang sering dipengaruhi oleh mutasi tersebut seperti penyusunan semula, dan/atau delesi, biasanya melibatkan bahagian-bahagian promoter kor (Lindh et al. 1998), promoter pre-kor (Scaglioni et al. 1997), pre-kor (Carman et al. 1989; Ehata et al. 1996; Chu et al. 1998), kor (Thomas & Carman 1994; Nishizono et al. 1997) dan juga bahagian X (Kidd-Ljunggren et al. 1995, 1997; Hsia et al. 1997).

Kajian-kajian yang lepas banyak bertumpu kepada sistem imun perumah kerana protein HBe (HBeAg) dikatakan sebagai sasaran kepada sel limfosit T sitotoksik (cytotoxic T lymphocytes, CTL). Walaupun HBeAg dijumpai pada

permukaan sel tetapi tapak jalannya masih tidak jelas. Daripada model virus haiwan yang berkaitan (hepadnavirus itik) didapati delesi yang berlaku pada bahagian pre-kor genom menyebabkan kegagalan hepatosit untuk merembeskan HBeAg tetapi penghasilan virion berjangkit tidak terjejas. Pengetahuan tentang mekanisme penghasilan dan sekresi HBeAg telah digunakan untuk menyiasat korelasi di antara jujukan DNA dan penyakit yang berkaitan dengan HBV. Terdapat kes didalam sekumpulan pesakit hepatitis kronik terutamanya di negara Mediteranean dan Asia Timur yang menunjukkan viremia berterusan walaupun HBeAg tidak dapat dikesan (Carman dan Thomas 1991). Sepatutnya perubahan serokonversi HBeAg kepada anti-HBe menyebabkan pemberhentian replikasi virus [HBsAg masih lagi disintesis oleh hepatosit yang mengandungi kromosom yang diintegrasikan oleh virus (Harrison dan Zuckerman 1992)]. Keadaan ini dapat dijelaskan berdasarkan mutasi yang berlaku pada bahagian pre-kor genom dimana nukleotid G ditukarkan kepada A pada kedudukan 1896. Mutasi yang terjadi pada kodon 28 ini menghasilkan kodon penamat menyebabkan peptida isyarat tidak dapat disintesis. Oleh itu, HBeAg yang negatif tidak menunjukkan fasa serokonversi (Carman dan Thomas 1991; Harrison dan Zuckerman 1992).

Selain daripada mutasi pre-kor, mutasi pada bahagian kor juga dikaitkan dengan keterukan hepatitis. Didapati bertakut mutasi 'missense' (penukaran nukleotid yang menyebabkan perubahan kepada residu asid amino yang disintesis) dalam jujukan nukleotid pada gen kor daripada pesakit yang menghidapi infeksi kronik HBV di dalam segmen yang mengandungi 54 nukleotid, i.e nukleotid (nt) 2150-2203 (kodon 84 hingga 81 daripada permulaan gen kor) iaitu pada kelompok mutasi (mutation clustering region, MCR) (Chuang et al. 1993). Kajian lain ada menunjukkan

mutasi pada gen X juga memainkan peranan yang penting dalam hepatokarsinogenesis (Hsia et al. 1997).

1.15 HUBUNGAN MUTASI PRE-KOR DENGAN PENANDA HBeAg/HBe

Selepas penemuan HBeAg pada tahun 1972 (Magnius & Espmark 1972), ianya didapati berguna sebagai penanda bagi jangkitan dan kerosakan hepar (Lindh et al. 1996). Serokonversi kepada HBeAg dilihat sebagai penurunan replikasi virus dan pesakit biasanya akan sembuh. Ini mungkin disebabkan HBe adalah sasaran sistem imun perumah dan mutasi yang berlaku pada kawasan pre-kor (kawasan gen yang terlibat dalam sekresi HBeAg) boleh mempengaruhi keadaan ini (Ferrari et al. 1993). Banyak kajian yang melaporkan varian HBV mutasi pada kodon penamat (mutasi TAG pada nt 1896, iaitu mutasi yang menyebabkan HBeAg tidak dapat dikesan) adalah dikaitkan dengan keterukan kerosakan hepar pesakit HBV fulminan dan pesakit CLD (Hadziyannis et al. 1983; Carman et al. 1991; Chuang et al. 1993). Varian ini yang dianggap paling rapat dihubungkan dengan keterukan penyakit berdasarkan kekerapannya ditemui dalam pesakit hepar kronik dan fulminan (Harrison dan Zuckerman 1992)

Kajian lain yang dijalankan oleh Ton et al. (1993; 1996) mendapati adanya dua mutasi titik dalam bahagian pre-kor/kor, pada kodon 11 (C-1856) (tak bermakna, non-sense) dan kodon 13 dimana serin digantikan oleh threonin (mutasi missense). Ini menunjukkan genom pre-kor/kor HBV mempunyai variasi yang tinggi dan ia membolehkan HBV varian mengelakkan sistem imun perumah.

Postulasi yang sama juga dilaporkan di mana infeksi HBV yang mempunyai mutasi kodon penamat adalah lebih teruk berbanding dengan infeksi HBV oleh strain bukan mutan (Alberti dan Fattovich 1994; Carman et al. 1991; Cuthbert 1992) dengan alasan: kehadiran mutasi kodon penamat dan mutasi 'missense' pada tapak pemprosesan karboksi-terminal protein pre-kor/kor (kodon 147-155) mungkin adalah mekanisme adaptif HBV untuk mengurangkan pengeluaran dan sekresi protein virus agar dapat mengelakkan diri daripada sistem imun perumah seterusnya mengekalkan rintangan virus (Chuang et al. 1993). Ia juga boleh mengalami pemilihan positif (positive selection) daripada infeksi campuran (Okamoto et al. 1990) di mana virus varian berupaya menggantikan virus jenis liar dalam infeksi campuran pembawa asimptomatik setelah serokonversi berlaku.

Walau bagaimanapun terdapat kajian di mana infeksi oleh strain HBV yang mengandungi mutasi kodon penamat (TAG) tidak dapat dikaitkan dengan perkembangan semua kes penyakit hepatitis fulminan (Lindh et al. 1995). Ini adalah kerana kehadiran kodon penamat bukan satu-satunya faktor yang terlibat dalam perkembangan penyakit yang disebabkan oleh HBV (Carman et al. 1991). Lindh et al. (1996) menyatakan kajian-kajian terdahulu hanya tertumpu kepada pembawa antibodi HBe yang kebanyakannya daripada kawasan Mediterranean dan Timur Jauh yang sudah pun mempunyai kerosakan hepar yang teruk dan viraemik. Oleh sebab itu penemuan mutasi TAG (mutasi kodon penamat) hanya membuktikan mengapa HBeAg tidak dijumpai di dalam pesakit terabit dan bukannya mutasi TAG sebagai penyebab kerosakan hepar. Sebaliknya Lindh et al. (1996) menyatakan bahawa kerosakan hepar adalah lebih teruk lagi pada pesakit yang dijangkiti dengan strain C-1858 dan bukannya pada pesakit yang dijangkiti oleh strain TAG. Kajian lain yang

dijalankan juga menunjukkan mutan pre-kor ini boleh didapati di dalam pesakit ASC (pembawa asimtomatik) yang positif terhadap anti-HBe (Chuang et al. 1993). Oleh itu, hubungan di antara penyakit hepar dan kehadiran mutasi kodon penamat pre-kor tidak boleh dianggap sebagai hubungan penyebab (Lindh et al. 1995, 1996). Kemungkinan kehadiran kodon penamat pre-kor adalah semata-mata strategi HBV untuk mengurangkan penghasilan protein virus dan mengelakkan diri daripada sistem imun perumah (Chuang et al. 1993).

1.16 'STEM-LOOP' PADA ISYARAT ENKAPSIDASI PRE-GENOM HBV

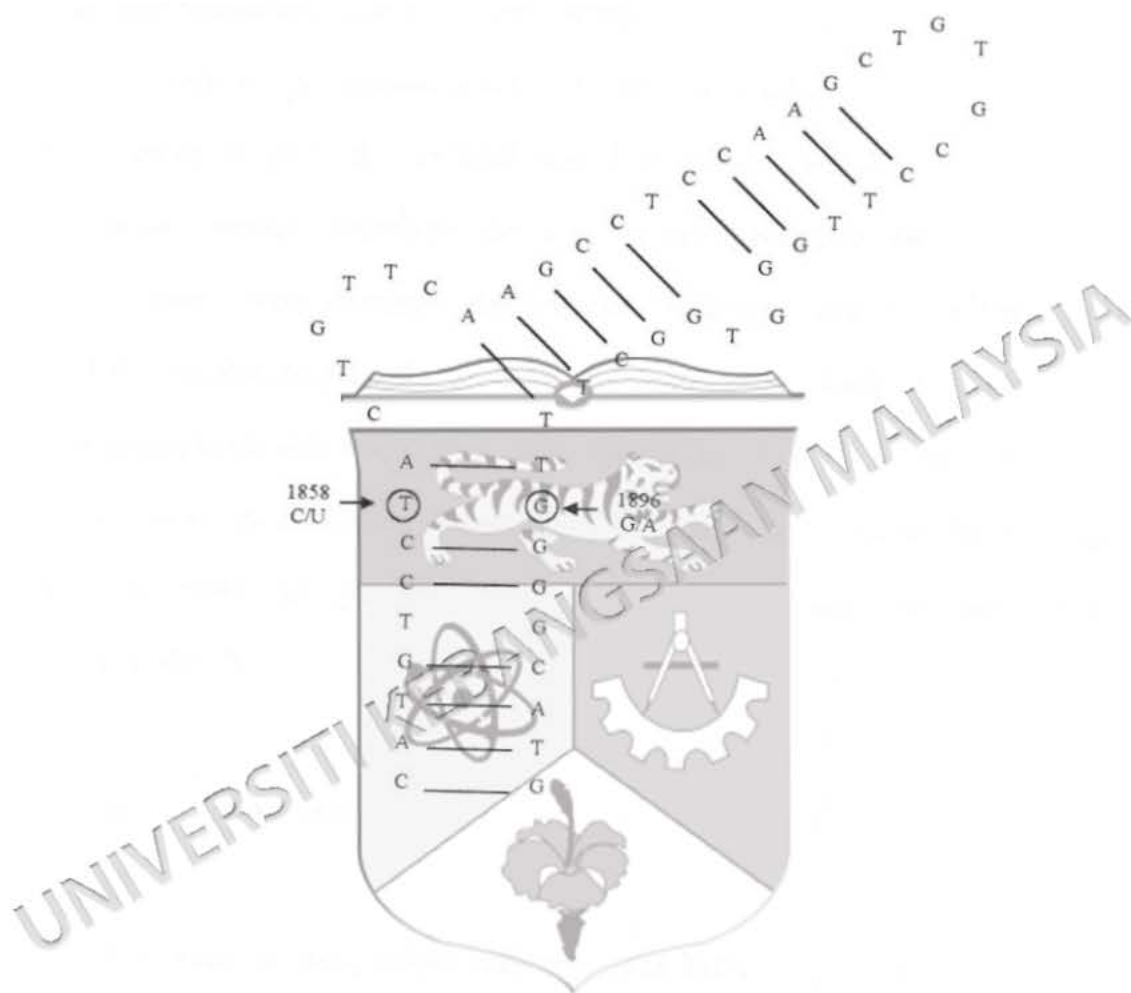
Bahagian pre-kor HBV adalah satu rangka bacaan terbuka (ORF) pendek (29 asid amino) yang mendahului gen kor (Rajah 1.3). Semasa replikasi virus, kedua-dua mRNA pre-kor dan kor akan dihasilkan. mRNA prekor akan bertindak sebagai pengutus untuk protein prekor (protein prekor berfungsi sebagai pre-kursor/isyarat untuk sekresi protein HBe), manakala mRNA kor akan bertindak sebagai pengutus untuk protein kor (protein kor akan membentuk nukleokapsid partikel virus) (Ganem & Varmus 1997). Satu subset mRNA kor akan dibungkus (packaging) bersama-sama polimerase ke dalam nukleokapsid yang berfungsi sebagai pre-genom untuk ditukarkan menjadi DNA melalui proses transkripsi berbalik (reverse transcription). Pembungkusan mRNA kor (juga dikenali sebagai RNA pre-genom kerana ianya bertindak sebagai pre-genom virus) sebenarnya adalah satu langkah utama dalam kitar replikasi HBV. Proses pembungkusan ini diarahkan oleh satu unsur *cis* pendek pada hujung 5' mRNA kor (Junker-Niepmann et al. 1990). Unsur ini dikenali sebagai enkapsidasi pre-genom yang mengandungi jujukan yang terdiri daripada 2/3 bahagian 3' pre-kor dan beberapa nukleotid pertama gen kor. Jujukan RNA pregenom tersebut

menyebabkan wujudnya struktur 'stem-loop' atau 'hair-pin' akibat daripada perpasangan bes (base-pairing) (Rajah 1.7) (Shih et al. 1993; Laskus et al. 1994; Lindh et al. 1996).

Struktur ini didapati dapat menghadkan variasi mutasi titik pada pre-kor kerana perpasangan-bes adalah spesifik. Mutasi pada nt 1896 daripada G→A (TAG, mutasi kodon penamat) dapat dijelaskan melalui struktur ini. Mutasi TAG dapat ditoleransi kerana U-1858 boleh membentuk pasangan bes samada dengan G atau A pada nt 1896. Walau bagaimanapun, pada strain C-1858, mutasi G→A tidak berlaku pada nt 1896 kerana ianya bukan C tidak dapat membentuk pasangan bes dengan A dan ini akan merosakkan proses enkapsidasi dan replikasi virus (Lindh et al. 1996). Ini menunjukkan bahawa peranan struktur ini perlu diambil-kira dalam kajian mengenai mutasi pada bahagian pre-kor kerana ia dapat mempengaruhi corak mutasi kodon penamat.

1.17 OBJEKTIF KAJIAN

Kajian-kajian yang lepas telah menunjukkan kepentingan penentuan jujukan pre-kor genom HBV dalam mengenal-pasti patogenisiti penyakit yang disebabkan oleh virus ini (Carman dan Thomas 1991). Melalui bacaan jujukan nukleotid, mutasi-mutasi dapat dikesan. Mutasi yang kerap dijumpai dan mempunyai hubungan dengan pengekspresan genetik virus adalah mutasi kodon penamat (TAG) pada bahagian pre-kor virus. Apabila mutasi jenis ini berlaku, HBeAg tidak dapat dihasilkan di dalam darah, tetapi penghasilan virion berjangkit masih diteruskan (Carman dan Thomas 1991). Terdapat juga keadaan di mana jangkitan vertikal (dari ibu kepada anak) telah



RAJAH 1.7 Perpasangan bes antara nukleotid 1958 dan 1896 di dalam struktur stem-loop RNA virus hepatitis B.
C: sitosin, U: urasil, G: guanin, A: adenin dan T: timidin

Sumber: Lok et al. (1994)

dikaitkan dengan hepatitis fulminan pada bayi. Bayi tersebut yang dilahirkan oleh ibu yang positif terhadap anti-HBe biasanya mengalami hepatitis fulminan selepas 3 hingga ke 4 bulan hidup, manakala bayi yang dilahirkan oleh ibu yang positif terhadap HBeAg akan mengalami keadaan seperti pembawa kronik hepatitis B (Bahn et al. 1995). Ini membuktikan bahawa mutasi pre-kor boleh dikaitkan dengan hepatitis fulminan. Selain daripada itu, terdapat juga kes di mana kehadiran mutan TAG mempengaruhi rawatan interferon ke atas pesakit. Biasanya selepas rawatan interferon, pesakit yang dijangkiti dengan virus 'wild-type' dikesan negatif untuk HBV-DNA, manakala bagi pesakit di mana terdapatnya mutan TAG, keadaan viremia akan berterusan (Fattovich et al. 1995). Jadi, oleh kerana sebab-sebab yang tersebut di atas, maka kajian ini dijalankan. Kajian ini melibatkan tiga kumpulan pesakit yang dijangkiti oleh HBV iaitu pembawa asimtomatik, hepatitis kronik dan juga pesakit kanser hepar (HCC).

Objektif penyelidikan ini adalah:

1. Menentukan sekuens/jujukan nukleotid pada bahagian pre-kor genom HBV pada pesakit yang positif terhadap HBsAg di Malaysia.
2. Menentukan hubungan antara mutasi yang berlaku di pre-kor genom HBV dengan penanda jangkitan hepatitis B virus.
3. Menentukan hubung-kait penanda-penanda HBV pada ketiga-tiga kumpulan kajian iaitu pembawa asimptomatik (ASC), pesakit hepatitis kronik (CC) dan pesakit kanser hepar (HCC).

RUJUKAN

- Alberti, A. & Fattovich, G. 1994. Interferon therapy for the anti-HBe positive form of chronic hepatitis B. *Antiviral Res.* **24**(2-3):145-153.
- Albin, C. & Robinson, W.S. 1980. Protein kinase activity in hepatitis B virions. *J. Virol.* **34**:297-302.
- Almeida, J.D., Rubenstein, D., Stott, E.J. 1971. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet* **2**:1225-7
- Bahn, A., Hilbert, K., Martine, U., Westeadt, J., von Weizsaker, F., Wirth, S. 1995. Selection of a precore mutant after vertical transmission of different hepatitis B virus variants is correlated with fulminant hepatitis in infants. *J. Med. Virol* **47**(4):336-341.
- Baker, B. L., Bisceglie, A. M. D., Kaneko, S., Miller, R., Feinstone, S. M., Waggoner, J. G. & Hoofnagle, J. H. 1990. Determination of hepatitis B virus DNA in serum using the polymerase chain reaction, clinical significance and correlation with serological and biochemical markers. *Hepatology* **13**:632-636.
- Bayer, M.E., Blumberg, B.S. & Warner, B. 1968. Particles associated with Australia antigen in sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature* **218**:1057-1059.
- Benjelloun, S., Tong, S., Li, J., Menfalout, L., Trepo, C. & Benslimane, A. 1993. Pre-core mutation associated with lack of hepatitis B e antigenemia in Moroccan asymptomatic carriers of the virus. *Res. Virol.* **144**(2):159-167.
- Bernstam, V.A. 1992. *Handbook of gene level diagnostics in clinical practice*. Florida: CRC Press, Inc.
- Blumberg, B.S. 1997. Perspective – Hepatitis B virus, the vaccine, and the control of primary cancer of the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:7121-7125.
- Blumberg, B.S., Alter, H.J. & Visnich, S. 1965. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA.* **191**:541-546.
- Blum, H.E., Moradpour, D., von Weizsaker, F., Wieland, S., Peters, T., Raseneck, J.W. 1997. Hepatitis B virus mutants-clinical significance. *Z. Gastroenterol.* **35**(5):347-355.
- Bonino, F., Rosina, F., Rizzetto, M., Rizzi, R., Chiarberge, E., Tardanico, R., Callea, F. & Verme, G. 1986. Chronic hepatitis B in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and anti-HBe. *Gastroenterology* **90**:1268-1273.

- Brown, J.L., Carman, W.F. & Thomas, H.C. 1990. The hepatitis B virus. *Baillieres. Clin. Gastroenterol.* **4**(3):721-747.
- Burrell, C.J., Mackay, P., Greenway, P. J., Hofsheinier, P. H. & Murray, K. 1979. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR 322. *Nature* **279**:43-47.
- Carloni, G., Colloca, S., Delfini, C., Manzin, A., Clementi, M. & Gilbert, F. 1987. Detection of HBV infectivity by spot hybridization in HBeAg negative chronic carriers: HBV-DNA in sera from asymptomatic and symptomatic subjects. *J. Med. Virol.* **21**:15-23.
- Carman, W.F., Hadziyannis, S., McGarvey, M.J., Jacyna, M.R., Karayiannis, P., Makris, A. & Thomas, H.C. 1989. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *The Lancet* 588-591.
- Carman, W.F. & Thomas, H.C. 1991. Genetically defined variants of hepatitis B virus. *Rev. Med. Virol.* **1**:29-39.
- Carman, W.F., Fagan, E.A., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Tassopoulos, N.C., Williams, R. & Thomas, H.C. 1991. Association of a pre-core genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis. *Hepatology* **14**(2):219-222.
- Carman, W.F., Ferrao, M., Lok, A.S.F., Ma, O.C.K., Lai, C.L., Thomas, H.C. 1992. Precore sequence variation in chinese isolates of hepatitis B virus. *J. Inf. Dis.* **165**:127-133.
- Chu, C.M., Yeh, C.T. & Liaw, Y.F. 1998. Low-level viraemia and intracellular expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in HBsAg carriers with concurrent hepatitis C virus infection. *J. Clin. Microbiol* **36** (7):2048-2086.
- Chuang, W.L., Omata, M., Ehata, T., Yokosuka, O., Ito, Y., Imazeki, F., Lu, S. N., Chang, W. Y. & Ohto, M. 1993. Pre-core mutations and clustering mutations in chronic HBV infection. *Gastroenterology* **104**:263-271.
- Cuthbert, J.A. 1991. Hepatitis B molecular variants with clinical significance? *Am. J. Med. Sci.* **302**(6):396-402.
- Dane, D.S., Cameron, C.H. & Briggs, M. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet* **1**:695-698.
- Delidow, B.C., Lynch, J.P., Peluso, J.J. & White, B.A. 1993. *Polymerase Chain Reaction: Basic Protocols: Current Methods and Application*. New Jersey: Humana Press.
- Edwards, M.S. 1988. Hepatitis B serology - help in interpretation. *Pediatr. Clin. North Am.* **35**:503-515.

- Ehata, T., Yokosuka, O., Imazeki, F., Omata, M. 1996. Point mutation in precore region of hepatitis B virus: sequential changes from 'wild' to 'mutant'. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **11**(6):566-574.
- Fattovich, G., McIntyre, G., Thursz, M., Colman, K., Giuliano, G., Alberti, A., Thomas, H.C., Carman, W.F. 1995. Hepatitis B virus precore/core variation and interferon therapy. *Hepatology* **22**(5):1355-1362.
- Ferrari, C., Penna, A., Bertoletti, A., Fiaccadori, F. 1993. Cell mediated immune response to hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Arch. Virol. Suppl.* **8**:91-101.
- Fujiwara, K., Yokosuka, O., Ehata, T., Chuang, W.L., Imazeki, F., Saisho, H. and Omata, M. 1998. The two different states of hepatitis B virus DNA in asymptomatic carriers: HBeAg-positive versus anti-HBe-positive asymptomatic carriers. *Dig. Dis Sci.* **43**(2):368-376.
- Ganem, D. 1996. *Fields Virology*. London: Longman Press.
- Ganem, D. & Varmus, H.E. 1997. The molecular biology of the hepatitis B viruses. [Review] *Annu. Rev. Biochem* **56**:690-693.
- Gallaso, J.G., Richard, J.W. & Thomas, C.M. 1990. Ed. ke 3. *Antiviral agents and therapy*. New York: Raven Press.
- Gray, J.J. & Wreghitt, T.G. 1992. Laboratory techniques in the diagnosis and assesment of hepatitis B virus infection. *Genitourm. Med.* **68**:263-268.
- Hadziyannis, S.J., Lieberman, H.M., Karvountzis, G.G., Shafritz, D.A. 1983. Analysis of liver disease, nuclear HBeAg, viral replication and HBV-DNA in liver and serum HBeAg vs anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* **3**:656-662.
- Harrison, T.J. & Zuckerman, A.J. 1992. Variants of hepatitis B virus. *Vox Sang* **63**:161-167.
- Havens, W.P. Ward, R. & Drill, V. A. 1944. Experimental production of hepatitis by feeding icterogenic materials. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **57**:206.
- Hollinger, F.B. & Dreesman, G.R. 1979. Hepatitis B virus antigen and albumin receptors. *Gastroenterol.* **76**:641.
- Hsia, C.C., Nakashima, Y. & Tabor, E. 1997. Deletion mutants of the hepatitis B virus X gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**(3):726-729.
- Jung, M.C., Stemler, M., Weimer, T., Spengler, U., Dohrmann, J., Hoffman, R., Eichelaub, D., Eisenburg, J., Paumgartner, G., Rietthmuller, G., Will, H. &

- Pape, G.R. 1990. Immune response of peripheral blood mononuclear cells to HBeAg-antigen of hepatitis B virus. *Hepatology* **13**(4):637-643.
- Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R. & Schaller, H. 1990. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* **9**(10):3389-96.
- Kaneko, S., Miller, R.H., Feinstone, S.M., Unoura, M., Kobayashi, K., Hattori, N. & Purcell, R.H. 1989. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:312-316.
- Kidd-Ljunggren, K., Oberg, M. & Kidd, A.H. 1995. The hepatitis B X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences. *J. Gen. Virol.* **76**(Pt9):2119-2130.
- Kidd-Ljunggren, K., Oberg, M. & Kidd, A.H. 1997. Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: implications for HBeAg status and disease. *J. Gen. Virol.* **78**(Pt6):1469-1478.
- Kim, W.H., Kim, K.H., Chung, J.P., Kang, J.K. & Park, I.S. 1993. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver diseases. *Yonsei Med. J.* **34**(2):158-165.
- Koike, K. 1995. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology* **38**(3-4):134-142.
- Kumar, V., Cotran, R.S. & Robbins, S.L. 1992. *Basic Pathology*. Ed. ke-5. Philadelphia: W. B. Saunders.
- Kwok, S. & Higuchi, R. 1989. Avoiding false positive with PCR (Product Review). *Nature* **339**:237-238.
- Laskus, T., Rakela, J. & Persing, D.H. 1994. The stem-loop structure of the cis-encapsidation signal is highly conserved in naturally occurring hepatitis B virus variants. *Virology* **200**:809-812.
- Le Bouvier, G.L. 1973. Subtypes of hepatitis B antigen, clinical relevance? *Ann. Intern. Med.* **79**:694-696.
- Liaw, Y.F., Tai, D.I., Chu, C.M. & Chen, T.J. 1988. The development of cirrosis in patients with chronic type B hepatitis: A prospective study. *Hepatology* **8**:493-496.
- Liaw, Y.F. 1997. Current therapeutic trends in therapy for chronic viral hepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **12**(9-10):S346-S353

- Lindh, M., Furuta, Y., Vahlne, A., Norkrans, G. & Horal, P. 1995. Emergence of precore TAG mutation during hepatitis B e seroconversion and its dependence on pregenomic base pairing between nucleotides 1858 and 1896. *Journal of Infectious Disease* **172**:1343-1347.
- Lindh, M., Horal, P., Dhillon, A.P., Furuta, Y., Norkrans, G. 1996. Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology* **24** (3):494-501.
- Lindh, M., Gustavson, C., Mardberg, K., Norkrans, G., Dhillon, A.P., Horal, P. 1998. Mutations of the nucleotide 1762 in the core promoter region during hepatitis B e seroconversion and its relation to liver damage in hepatitis B e antigen carriers. *J. Med. Virol.* **55**(3):185-190.
- Lok, A.S.F., Bozkaya, H. & Ayola, B. Hepatitis B Virus Pre-core/core Gene Mutants: Epidemiology 1996. *Proceedings of IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*:104-107.
- Lok, A.S., Akarca, U. & Greene, S. 1994. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **91**(9):4077-4081.
- Lopez-Alcorocho, J.M., Moraleda, G., Bartolome, J., Castillo, I., Cotonat, T., Aguilar, J., Ortega, E., Pons, J.A., Salmeron, J., Vazquez-Iglesias, J.L. et al. 1994. Analysis Of hepatitis B pre-core region in serum and liver of chronic hepatitis B virus carriers. *J. Hepatology* **21**(3):353-360.
- Magnius, L., Kaplan, L., Vyas, G.N. & Perkins, H.A. 1975. New virus specified determinant of hepatitis B surface antigen. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section B, Microbiology*. **83**(3):295-7.
- Magnius, L. & Espmark, A. 1972. A new antigen complex co-occurring with australia antigen. *Acta Path Microbiol. Scand.* **80**:335-337.
- Miller, R.H., Kaneko, S., Chung, C.T., Girones, R. & Purcell, R.H. 1989. Compact organization of hepatitis B genome. *Hepatology*. **16**(1):36-41.
- Mondelli, M., Manns, M. & Ferrari, C. 1988. Does the immune response play a role in the pathogenesis of chronic liver disease? *Arch. Pathol. Lab. Med.* **112**:489-497.
- Nishizono, A., Kohno, K., Takita-Sonada, Y., Hiraga, M., Terao, H., Fujioka, T., Nasu, M., Mifune, K. 1997. Sequential analyses of the mutations in the core upstream and precore regions of hepatitis B virus genome in anti-HBe positive-carriers developing acute exacerbation. *J. Med. Virol.* **53**(3):266-272.

- Nowak, M.A., Bonhoeffer, S., Hill, A.M., Boehme, R., Thomas, H.C., McDade, H. 1996. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**:4398-4402.
- Ogata, N., Miller, R.H., Ishak, K.G. 1993. The complete nucleotide sequence of pre-core mutant of HBV implicate in fulminant hepatitis and its biological characterization in chimpanzees. *Virology* **194**:263-276.
- Okamoto, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. 1996. Pre-core/core mutants of hepatitis B virus: pathogenetic implications. *Proceedings of IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*:121-126.
- Okamoto, H., Yotsumoto, S., Akahane, Y., Yamanaka, T., Miyazaki, Y., Sugai, Y., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. 1990. Hepatitis B virus with pre-core region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J. Virol.* **64**:1298-1303.
- Pang, T.K. 1987. *Virologi asas dan klinikal*. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa dan Pustaka.
- Park, Y.M, Kim, B.S. and Tabor, E. 1997. Precore stop codon mutation in hepatitis B virus from patients with hepatocellular carcinoma. *Korean J. Intern. Med.* **12**(2):201-207.
- Pollack, J.R., Ganem, D. 1994. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J. Virol.* **68**(9):5579-87.
- Rizzeto, M., Purcell, R.H., Gerin, J.L. and Verme, G. 1996. Viral hepatitis and liver disease. *Proceedings of IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*.
- Robinson, R.L. & Lutwick, L.I. 1976. The virus of hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **295**:1168-1175.
- Robinson, W.S., Clayton, D.A. & Greenman, R.L. 1974. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.* **14**:384-391.
- Runkel, L., Fischer, M., & Schaller, H. 1993. Two codon insertion mutations of the HBx define two separate regions necessary for its trans-activation function. *Virology* **197**(2):529-536.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Ed. ke 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nickelen, S. & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**:5643-5647.

- Scaglioni, P.P., Melegari, M. & Wands, J.R. 1997. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore reading frame. *Virology* **233**(2):374-381.
- Shih, L.N., Sheu, J.C., Wang, J.T., Huang, G.T., Chen, J.S., Sung, J.L., Wang, T.H. & Chen, D.S. 1990. Detection of viral hepatitis B DNA by polymerase chain reaction in patients with hepatitis B surface antigen. *J. Med. Virol.* **30**:159-162.
- Summers, J., O'connel, A. & Millman, I. 1975. Genome of hepatitis B virus restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted Dane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**:4597-4601.
- Thomas, H.C. & Carman, W.F. 1994. Envelope and pre-core/core variants of hepatitis B virus. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **23**(3):499-514.
- Tillman, H., Trautwein, C., Walker, D., Michitaka, K., Kubicka, S., Boker, K and Manns, M. 1995. Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. *Gut* **37**:568-573.
- Tilzey, A. J., Laidler, P.W. & Banatvala, J. E. 1988. Reactivity and immunogenicity of a yeast-derived recombinant NA hepatitis vaccine in healthy young adults. Dalam Zuckerman, A. J. (pnyt.). *Viral hepatitis and liver disease*: 1047-1053. New York : Alan R. Liss.
- Ton S.H., Iskandar K., Noriah R and Thanaletchimy N. 1996. Nucleotide sequence of precore region of hepatitis B virus DNA in HBsAg-positif carriers in Malaysia. *Scand. J. Infect. Dis* **28**:543-548.
- Ton S.H., Lim L.H., Noriah R., Thanaletchimy N. and Cheong S.K. 1990. Serum HBV-DNA in blood donors. *Mal. J. Med. Lab. Scs.* **7**(1):12-14.
- Ton S.H. 1989. *Biologi Virus Hepatitis B Manusia dan Jangkitannya di Malaysia*. Kuala Lumpur: Infopub.
- Ton S.H., Lopez C.G. and Hasnah H. (1979). Prevalence of anti-HBe in Malaysia male blood donors and its correlation with DNA polymerase activity. *Southeast Asia J. Trop. Med. Pub. Health.* **10**:1-6.
- Ton S.H. Watts, R., Karayiannis, P. and Thomas, H.C. (1993). Nucleotide sequence of pre-core/core region of a HBV from a Malaysian Carrier. *Proc. 18th. Malaysian Biochem. Soc. Conference 1993*:166-170.
- Ton S.H., Yeoh K.S., Lim W.C., Noriah R., Cheong S.K., Thanaletchimy N. 1995. Infectiousness of HBeAg carriers in Malaysia. *J. Trop. Med. Hyg* **98**:277-280.
- Zarski, J.P., Bohn, B, Bastie, A, Pawlotsky, J.M., Baud, M., Bost-Bezeaux, F., Tran van Nhieu, J., Seigneurin, J.M., Buffet, C. & Dhumeaux, D. 1998.

Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J. Hepatol.* **28**(1):27-23.

Zuckerman, A. J. 1976. Twenty-five centuries of viral hepatitis. *Rush-Prebyterian-St. Lukes Med. Bull.* **15**:57.

