Kwantitatieve HBsAg: herontdekking van een bestaande bepaling

Quantification of HBsAG: rediscovery of an existing analysis

G.J. Boland[1], A.C.T.M. Vossen[2], S. Harkisoen[3]

Samenvatting

Het 'Hepatitis B Surface Antigen' (HBsAg) is lange tijd alleen als kwalitatieve bepaling gebruikt voor het vaststellen van een infectie met het hepatitis B-virus. In de afgelopen jaren werd de bepaling ook kwantitatief gebruikt. Het 'Hepatitis B Surface Antigen' is afkomstig van een RNA-transcript van het cccDNA in de met hepatitis B-virus geïnfecteerde hepatocyten. De replicatie van hepatitis B-virus (vorming van hepatitis B-virus DNA) verloopt via een ander RNA-transcript, het zogenoemde 'pregenomic RNA', door reverse-transcriptie. Deze laatste route wordt geremd door nucleos(t)ide analogen. Er wordt verondersteld dat de hoeveelheid 'Hepatitis B Surface Antigen' in het serum een betere reflectie is van de hoeveelheid hepatitis B-virus cccDNA in de lever dan het plasma hepatitis B-virus DNA. Kwantificering van het 'Hepatitis B Surface Antigen' kan met assays op de Architect-, de Elecsys- of de LIAISON-analysers uitgevoerd worden. Literatuur toont aan dat de verschillende assays goed met elkaar overeenkomen. De klinische relevantie van de kwantificering van het 'Hepatitis B Surface Antigen' ligt in de voorspellende waarde voor reactivatie van hepatitis B-virus bij inactief dragerschap en voor het voorspellen van een respons bij antivirale therapie met interferon-alfa en nucleos(t)ide analogen.

(Tijdschr Infect 2015;10(4):94-101)

Summary

For a long time, detection of Hepatitis B surface antigen was only used to detect an infection with hepatitis B virus. In recent years Hepatitis B surface antigen in serum can also be quantified. Hepatitis B surface antigen is derived from an RNA transcript from hepatitis B virus cccDNA in infected hepatocytes. Hepatitis B virus DNA replication is derived from another RNA transcript, the so-called pre-genomic RNA. This route is inhibited by nucleotis(t)ides therapy. It is supposed that the Hepatitis B surface antigen level is a better reflection of the amount of cccDNA in the liver compared to plasma hepatitis B virus DNA. Quantification of HBsAg can be performed by serological assays on the Architect, Elecsys or LIAISON analysers. Literature shows excellent agreement between the assays. The quantification of Hepatitis B surface antigen may be clinically relevant in predicting hepatitis B virus reactivation in inactive carriers and prediction of response during antiviral therapy with interferon-alfa or nucleos(t)ide analogues.

Inleiding

In de afgelopen jaren is er een toenemende belangstelling voor de kwantitatieve bepaling van 'Hepatitis B Surface Antigen' (QHBsAg). Zowel bij de voorspelling van het natuurlijk beloop van hepatitis B, als ter evaluatie van de respons op behandeling kan deze bepaling binnen

[1]medisch moleculair microbioloog, afdeling Medische Microbiologie, Universitair Medisch Centrum, Utrecht [2]arts-microbioloog, afdeling Medische Microbiologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden [3]infectioloog, afdeling Interne Geneeskunde en Infectieziekten, Universitair Medisch Centrum, Utrecht.

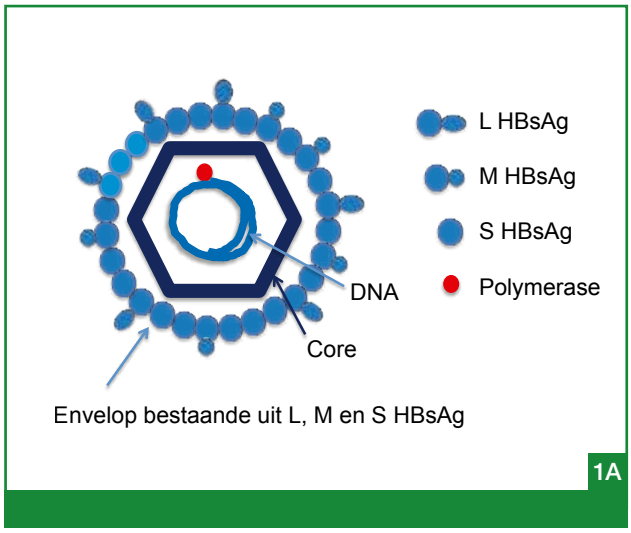
Correspondentie graag richten aan: mw. dr. G.J. Boland, medisch moleculair microbioloog, afdeling Medische Microbiologie, Huispostnummer G04.614, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht. Tel: 088 – 755 7637. E-mail: G.J.Boland@umcutrecht.nl.

Belangenconflict/financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: chronisch, diagnostiek, hepatitis B, klinische relevantie, kwantitatieve HBsAg.

Keywords: clinical relevance, chronic, diagnostics, hepatitis B, quantitative HBsAg.

Ontvangen 1 december 2014, geaccepteerd 22 april 2015.



Figuur 1A. Dane particle - HBV virion 42-45 nm.

de diagnostiek van een chronische hepatitis B-infectie worden gebruikt. In dit overzichtsartikel wordt ingegaan op de achtergrond en de toepassingsmogelijkheden van de QHBsAg-bepaling bij hepatitis B-virus monoinfectie en hiv/HBV-coïnfectie.

Het hepatitis B-virus

Het hepatitis B virus (HBV) behoort tot de *Hepadnaviridae*. Het virus bestaat uit een envelop (bestaande uit 'Hepatitis B Surface Antigen' (HBsAg)) en een kern met het core-antigeen en het HBV-DNA. Het HBV-DNA is gedeeltelijk dubbelstrengs en heeft een lengte van ongeveer 3200 nucleotiden.[1,2]

Het HBsAg is het oppervlakte-eiwit van het complete HBV-virusdeeltje. HBsAg is ontdekt door Baruch Samuel Blumberg in 1964-1965.[3,4] De associatie met hepatitis kwam pas eind jaren '60. Blumberg heeft in 1976 de Nobelprijs voor de geneeskunde gekregen en tegenwoordig wordt op de geboortedag van Blumberg, op 28 juli, de World Hepatitis Day gehouden. In het serum van geïnfecteerde personen is HBsAg detecteerbaar, dat spontaan bolvormige of langwerpige partikels vormt. Rijpe infectieuze bolvormige partikels bevatten HBV-DNA en worden 'Dane-particles' genoemd (zie *Figuur 1a*); slechts ongeveer 1/10.000 van de partikels bevatten het HBV-DNA.

Figuur 1b toont schematisch de HBV-replicatie. Het in de kern van de geïnfecteerde hepatocyt aanwezige 'covalently closed circular' (ccc) DNA speelt een belangrijke rol bij virale persistentie. Het HBsAg wordt gemaakt door translatie van RNA afkomstig van de transcriptie van cccDNA.[5,6]

De replicatie van het hepatitis B-genoom loopt via een ander RNA-transcript, het zogenaamde 'pregenomic RNA', dat ook van het cccDNA afkomstig is. Het HBV-polymerase heeft eveneens reverse-transcriptase activiteit. Dit enzym zorgt zowel voor de DNA naar RNA-transcriptie als de reverse transcriptie van pregenomic RNA naar HBV-DNA. Deze route staat los van de vorming van het HBsAg. Antivirale middelen die aangrijpen op de replicatie van het virus, zoals de polymeraseremmers tenofovir en entecavir, hebben dan ook invloed op de HBV-DNA-waarde in plasma en geen directe invloed op het cccDNA in de hepatocyten (zie *Figuur 1b*).

Bij HBeAg-positieve patiënten correleert de HBsAg-concentratie met de cccDNA-hoeveelheid en de hoogte van het HBV-DNA.[7-13] Bij HBeAg-negatieve patiënten is de correlatie minder duidelijk, waarschijnlijk omdat het HBV-DNA kan fluctueren en ondetecteerbaar kan zijn, terwijl het QHBsAg stabieler is.[6,14]

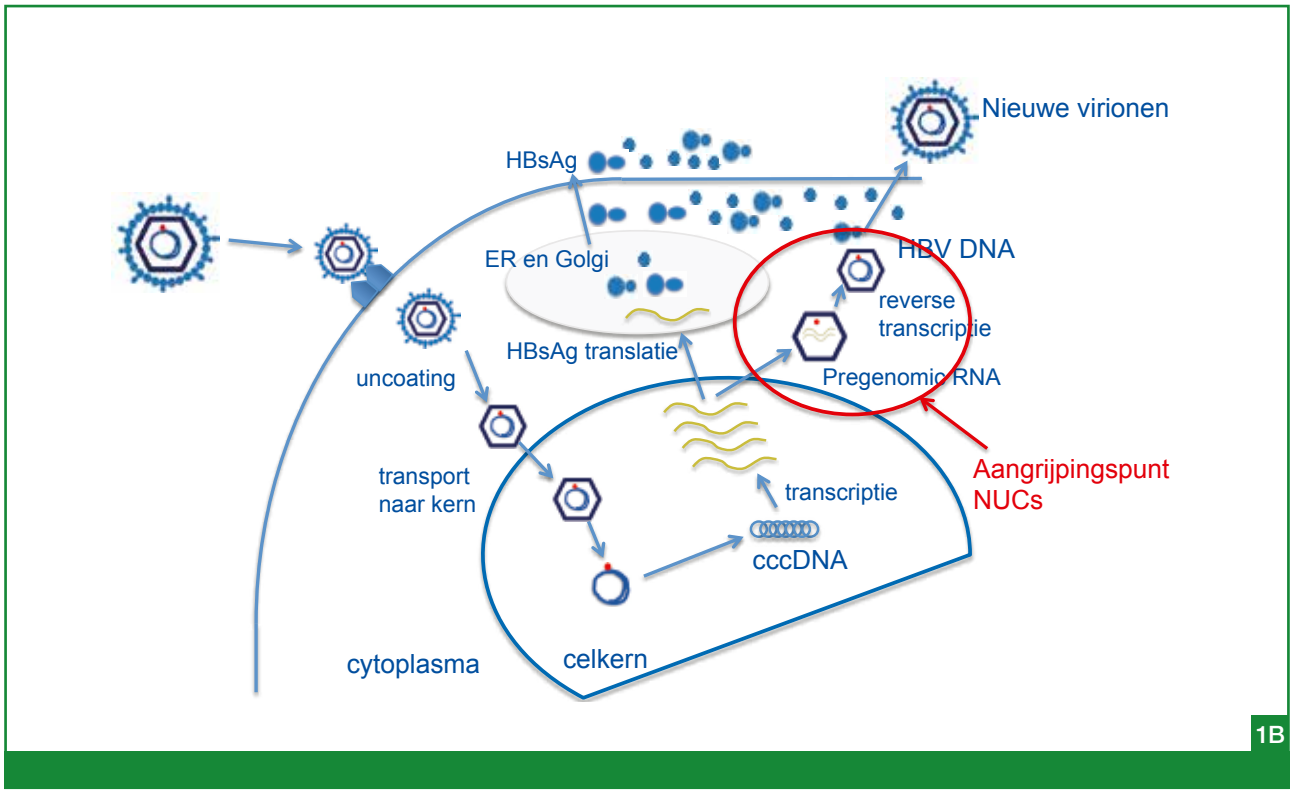
Huidige hepatitis B-diagnostiek

Screening op hepatitis B gebeurt met een kwalitatieve assay voor het HBsAg, bij voorkeur in combinatie met het anti-HBc. Aanwezigheid van het HBsAg, in combinatie met een anti-HBc, betekent dat een infectie aanwezig is. Een positieve anti-HBc, in afwezigheid van HBsAg, duidt echter meestal op een infectie in het verleden. Aanvullende serologische en moleculaire diagnostiek dient om een indruk te verkrijgen van het stadium van de infectie, de mate van virusreplicatie en daarmee de besmettelijkheid. In combinatie met gegevens over de mate van leverfibrose geeft dit inzicht in de ernst van de infectie en de noodzaak van behandeling. Antilichamen tegen het HBeAg zijn aanwezig bij inactief dragerschap of bij HBeAg-negatieve chronische hepatitis. Een hoog-positieve IgM anti-HBc is een sterke aanwijzing voor een acute infectie met het HBV. Voor de verdere diagnose en monitoring van patiënten met chronische hepatitis B is er een kwantitatieve HBsAg-bepaling beschikbaar. Moleculaire methoden die kunnen worden uitgevoerd zijn de kwantitatieve HBV DNA-bepaling, de HBV-genotypering en de resistentiebepaling.

Assays beschikbaar voor kwantificering van het HBsAg

Er zijn momenteel drie assays beschikbaar voor de kwantificering van het HBsAg. Deze assays zijn voor de Architect (HBsAg QT, Abbott Laboratories), de Elecsys (HBsAg II Quant, Roche Diagnostics) en de LIAISON-XL (Murex HBsAg Quant, DiaSorin, Saluggia).

De detectielimiet van de QHBsAg-bepalingen is 0,05 IU/mL. De maximale meetwaarde is afhankelijk van de gebruikte assay 130-250 IU/mL. Meetwaarden in sera



Figuur 1B. HBV-replicatie.

van patiënten liggen vaak hoger waardoor automatische en/of handmatige voorverdunning nodig zijn om in het goede meetbereik terecht te komen.[7,8,15,17,28] De correlatie tussen deze assays is goed ([r]=0.97; p<0.001) voor alle HBV-genotypes en in lamivudine-resistente mutanten.[18-21]

Anders dan voor een HBsAg-test die gebruikt wordt voor screening, is een zo laag mogelijke detectiegrens minder belangrijk.

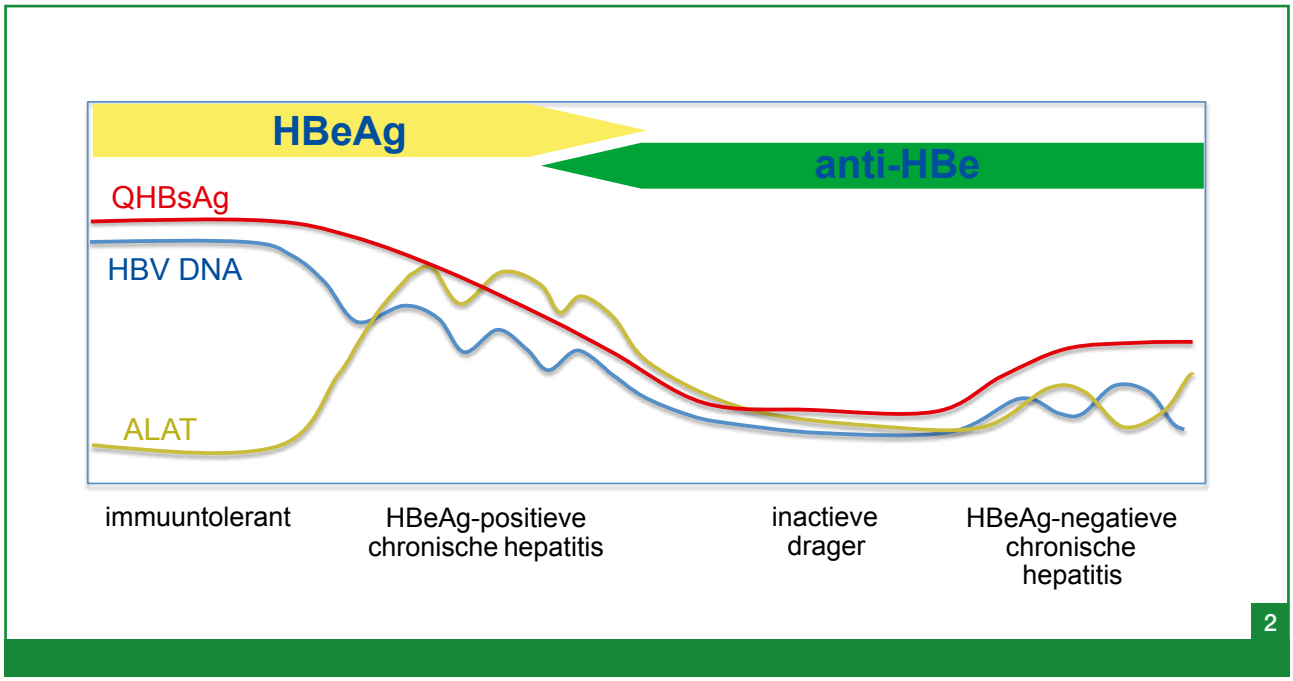
De waarde van de QHBsAg wordt uitgedrukt in IU/mL en refereert naar de WHO-standaard (NIBSC code 00/588; WHO Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A; IU/ml). Een QHBsAg-bepaling heeft een goede reproduceerbaarheid en kan uitgevoerd worden op de standaard serologie-apparatuur. Dit laatste is een voordeel ten opzichte van een kwantitatieve HBV-DNA bepaling waarvoor moleculaire faciliteiten beschikbaar moeten zijn.

Natuurlijk beloop en kwantitatieve HBsAg

Gedurende een chronische HBV-infectie zijn er vier immunologische fasen te onderscheiden: de immuuntolerante fase, de immuunactieve fase, de inactieve HBsAg-dragerfase en de (intermitterende) reactivatie fase. Op basis van de HBV-DNA, QHBsAg en ALAT kan een onderscheid worden gemaakt zoals schematisch weergegeven in *Figuur 2* op pagina 97.

De immuuntolerante fase wordt gekarakteriseerd door een positief HBeAg, een hoog HBV-DNA (≥ 10^{E7} kopieën/ml), een hoog QHBsAg en een normaal ALAT. Tijdens de immuunactieve fase vindt HBe-seroconversie plaats waarbij het HBeAg verdwijnt en anti-HBe wordt gevormd. Tevens daalt de HBV-DNA en stijgt het ALAT. De immuunactieve fase gaat over in de inactieve dragerfase waarbij het HBeAg negatief blijft en de HBV-DNA, het QHBsAg en het ALAT laag zijn. Ten slotte kan gedurende de inactieve dragerfase intermitterend een reactivatie plaatsvinden waarbij de HBV-DNA en ALAT variëren. Hoewel het niet altijd duidelijk is wanneer een reactivatie optreedt, zijn het gebruik van immuunsuppressiva en chemotherapeutica bekende factoren die een HBV-reactivatie kunnen veroorzaken. De vorming van leverfibrose begint na de immuuntolerante fase wanneer het ALAT stijgt.

Verschillende studies laten zien dat de meetwaarde (in IU/mL) van de QHBsAg in HBeAg-positieve patiënten hoger is dan HBeAg-negatieve patiënten.[7,22-24] De QHBsAg is het hoogst tijdens de immuuntolerante fase, variërend tussen 4,5 en 5 log10 IU/mL, en het laagst gedurende de HBsAg-dragerfase met waarden rond 3 log10 IU/mL. Er wordt een verschil gezien tussen Aziatische en Europese patiënten dat verklaard kan worden door een verschil in natuurlijk beloop van de chronische HBV-infectie, de route van HBV-transmissie,



Figuur 2. Fasen bij chronische hepatitis B.
Bron: S.N. Wong, A.S.F. Lok. Treatment of Hepatitis B: Who, When, and How? Arch Intern Med. 2006;166(1):9-12. Aangepast

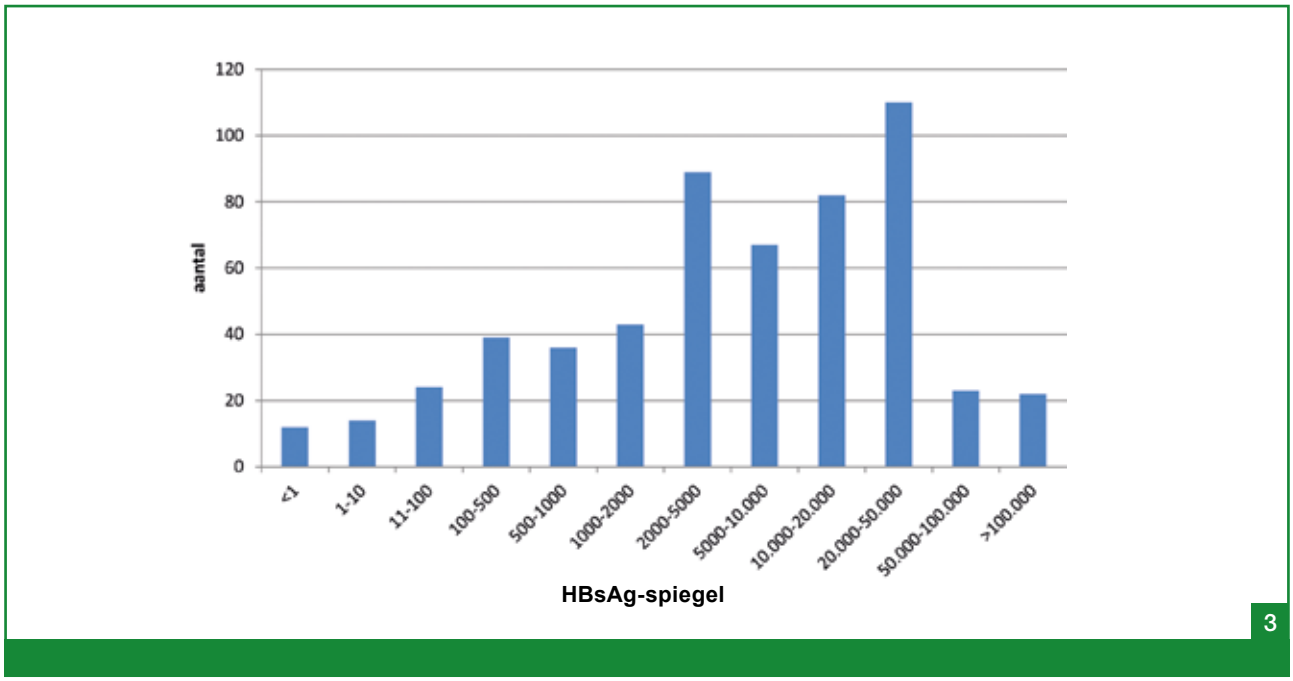
de distributie van genotype en snelheid van HBeAg-seroconversie.[25]
Binnen de fase van inactief dragerschap is het van belang om onderscheid te kunnen maken tussen degenen die een lage kans hebben op progressie naar de reactivatie-fase en degenen met een hoge kans op reactivatie. De QHBsAg zou hier een uitkomst in kunnen bieden. Waarden tot ca 2.000 IU/mL komen voor in patiënten met inactieve hepatitis B.[22] Bij een chronisch actieve hepatitis B liggen de waarden vaak hoger, tot boven 100.000 IU/mL. In *Figuur 3* staat een overzicht van de meest gevonden meetwaarden. Een recente Franse studie toonde bij asymptomatische HBeAg-negatieve patiënten met een persisterend normale ALAT dat een HBsAg-waarde boven 1000 IU/mL in combinatie met een HBV-DNA boven de 200 IU/mL een hoog risico op reactivatie hebben (sensitiviteit 92%, negatief voorspellende waarde 96%).[23] Kortom, de QHBsAg kan het determineren van de fase van een chronische HBV-infectie ondersteunen en kan bij HBeAg-negatieve patiënten bijdragen aan de identificatie van patiënten met inactief dragerschap en een goede prognose. Dit kan enerzijds gevolgen hebben voor de frequentie van monitoring en anderzijds bij indicatiestelling voor therapie.

Kwantitatieve HBsAg en therapie

In de huidige richtlijnen is een hoog HBV-DNA in combinatie met verhoogde transaminasen (en/of gecombineerd met een leverfibrose stadium ≥F2) een indicatie voor behandeling met antivirale therapie. Er is dan een verhoogd risico op levercirrose/leverfalen en levercarcinoom.[26-28] Ook bij een laag HBV-DNA wordt behandeling gestart bij verhoogde transaminasen en/of aanwezigheid van leverfibrose.[26-28] Onbehandelde patiënten dienen te worden vervolgd gezien het fluctuerende beloop van de infectie en ziekteactiviteit en daarmee een mogelijke toekomstige indicatie voor antivirale therapie.[15,28]

Het doel van de therapie is verbetering van de kwaliteit van leven en de overleving door ziekteprogressie te voorkomen. Een meetbaar eindpunt van de therapie is het bereiken van HBsAg-seroconversie (HBsAg negatief en vorming anti-HBs). Dit eindpunt wordt slechts zelden gehaald bij behandeling met nucleos(t)ide analogen. Andere eindpunten voor de therapie zijn: behalen van HBeAg-negativiteit, behalen van aanhoudende virale respons ('sustained viral response', SVR; ondetecteerbaar HBV-DNA), biochemische respons (normalisatie leverenzymen) en regressie van fibrose. Deze zijn alle geassocieerd met een verbetering in de leverhistologie.

Momenteel zijn er twee groepen geneesmiddelen geregistreerd voor de behandeling van chronische HBV-infectie, interferon-alfa (IFN-α) en de nucleos(t)ide analogen (NUCs). Het voordeel van de IFN-α is dat het een tijdelijke behandeling betreft van maximaal 48 weken waarbij langdurige immunologische controle kan worden



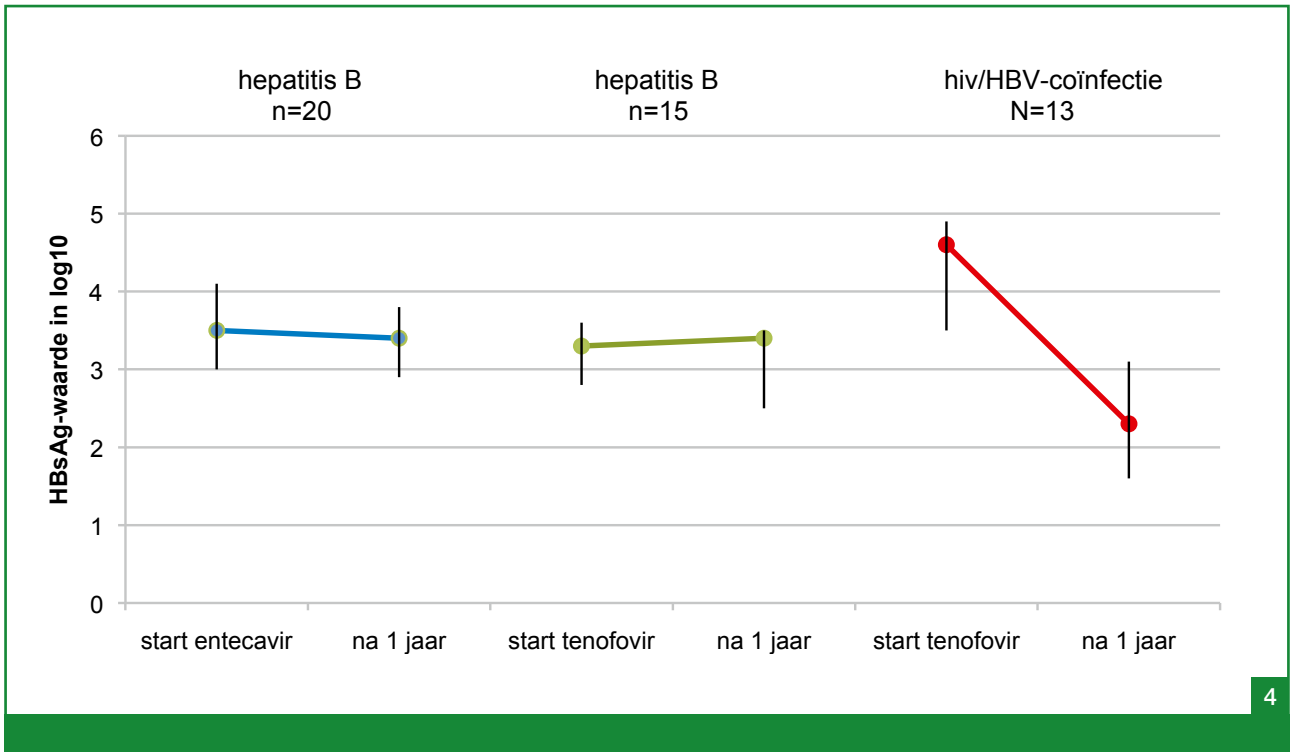
Figuur 3. Waardeverdeling HBsAg-spiegels.

nagestreefd met een redelijke kans op HBe-seroconversie (tot 30%). IFN-α therapie gaat echter gepaard met bijwerkingen en is succesvol bij een selecte groep patiënten. De andere optie, NUC-therapie waarvan tenofovir en entecavir momenteel als eerste keus worden geadviseerd, kunnen oraal worden toegediend en hebben weinig bijwerkingen. NUC-therapie moet echter langdurig tot levenslang worden gecontinueerd en heeft in vergelijking tot IFN-α lagere HBsAg-seroconversie percentages. IFN-α heeft naast een direct antiviraal effect ook een immuunmodulerend effect, terwijl NUCs uitsluitend gericht zijn op remmen van de replicatie van viraal DNA. Waarschijnlijk is dit de oorzaak van de snellere en sterkere daling van de QHBsAg bij de behandeling met IFN-α.

Bij patiënten die in aanmerking komen voor IFN-α behandeling kan QHBsAg een rol spelen in het voorspellen van succes van de behandeling. Bij Aziatische HBeAg-positieve patiënten met overwegend HBV-genotype B en C, die werden behandeld met IFN-α was een HBsAg <300 IU/mL in combinatie met een daling van ≥1log10 IU/ml na 24 weken behandeling geassocieerd met het bereiken van een SVR.[29] In een Nederlandse studie waarin patiënten met HBV-genotype A t/m D zijn geïncludeerd, bleek een HBsAg-waarde >20.000 IU/mL op week 24 of geen daling in de HBsAg-waarde op week 24 na behandeling voorspellend te zijn voor therapiefalen met een negatieve predictieve waarde (NPV) van 94-100%.[30] Hoewel er verschillen in SVR zijn tussen HBV-genotypes, geldt voor alle genotypes dat een daling in het QHBsAg geassocieerd is met een hogere kans op een SVR.[30,31] In de Europese richtlijn van de 'European Association for the Study of the Liver' (EASL) wordt geadviseerd de therapie met IFN-α te stoppen in HBeAg-positieve patiënten indien het HBsAg na drie maanden behandeling nog >20.000 IU/ml is of als er geen daling waargenomen is in het QHBsAg.[27]

Bij HBeAg-negatieve patiënten laten Europese studies zien dat een HBsAg-daling van ≥0,5 log IU/mL op week twaalf en een HBsAg <10 U/mL aan het eind van therapie is geassocieerd met SVR en negatief worden van het HBsAg.[11,12,13] In de Nederlandse behandelrichtlijn is opgenomen dat het QHBsAg bij behandeling met IFN-α patiënten kan identificeren met een zeer lage kans op respons op therapie. Bij HBeAg-negatieve patiënten dient overwogen te worden de therapie te stoppen indien na twaalf weken geen daling in het QHBsAg en minder dan 2log10 IU/ml daling van het HBV-DNA heeft plaatsgevonden.[28] De Europese richtlijn beveelt eveneens aan om bij HBeAg-negatieve patiënten de IFN-α therapie te stoppen als er op maand drie géén daling in het HBsAg is en géén 2log10 IU/ml daling in het HBV-DNA, vooral in genotype D.[27]

Bij patiënten met chronisch HBV en NUC-therapie is alleen bij HBeAg-positieve patiënten een associatie gevonden tussen QHBsAg en het succes van de behandeling.[32,33] In een groot internationaal gerandomiseerd onderzoek waarbij tenofovir werd vergeleken met een



Figuur 4. Verloop kwantitatieve HBsAg-waarde na drie jaar in hepatitis B-patiënten behandeld met entecavir of tenofovir en HBV/hiv-coïnfecties behandeld met tenofovir. Mediane waarde en range.

andere NUC, adefovir, hadden HBeAg-positieve patiënten die tijdens de behandeling op week 24 een daling van meer dan 2log10 IU/mL van het QHBsAg bereikten een grotere kans op HBsAg-verlies na drie jaar behandeling.[32] Voor HBeAg-negatieve patiënten was de HBsAg-waarde bij aanvang van de behandeling lager en de daling minder uitgesproken.[33] In een studie naar de kinetiek van QHBsAg bij de behandeling met entecavir in HBeAg-positieve patiënten werd een sterkere daling van het QHBsAg gezien in patiënten die HBeAg-negatief werden tijdens de therapie en in patiënten met HBV genotype A en D, in vergelijking met de genotypes B en C.[34] Ook de uitgangswaarde van het QHBsAg was echter hoger bij genotype A en D. Er was geen correlatie in de kinetiek van het HBV-DNA en het QHBsAg. In deze studie kon geen duidelijke toegevoegde waarde van het QHBsAg vastgesteld worden.[34] In de Nederlandse en Europese richtlijnen zijn geen adviezen opgenomen betreffende het QHBsAg tijdens NUC-therapie.

Vergelijking in kwantitatieve HBsAg tussen HBV-monoinfectie en HBV/hiv-coïnfectie

Een specifieke groep patiënten die extra belangstelling behoeven zijn de patiënten met een hiv/HBV-coïnfectie omdat een hiv-infectie een negatieve invloed kan hebben op het beloop van de HBV-infectie waardoor eerder levercomplicaties optreden. Enkele NUCs (lamivudine, tenofovir en emtricitabine) hebben zowel een antivirale werking tegen hiv als tegen HBV. Tot nu toe is het onduidelijk of de verandering in QHBsAg anders verloopt in patiënten met HBV-monoinfectie ten opzichte van patiënten met hiv/HBV-coïnfectie bij het starten van nucleos(t)ide analogen. Om deze vraag te beantwoorden hebben wij retrospectief data van twee academische centra verzameld van patiënten met HBV-monoinfectie en patiënten met hiv/HBV-coïnfecties. Patiënten werden geïncludeerd als ze tenminste twaalf maanden met entecavir (groep A, n=20, 50% HBeAg-positief) of tenofovir (groep B, n=15, 47% HBeAg-positief) werden behandeld. Groep C (HIV/HBV-coïnfectie, n=13, 69% HBeAg-positief) werd met een tenofovir-bevattend regime behandeld. De QHBsAg-waarde en HBV-DNA werd voor aanvang van de behandeling bepaald en op twaalf maanden. Patiënten uit groep B waren vaker voorbehandeld met andere antivirale middelen ten opzichte van groep A en C (53% versus 10% en 0%, p<0,01). Daarnaast was de HBV-DNA waarde in groep B lager ten opzichte van groep A en C (log mediaan 4,5 versus 6,6 en 8,3 IU/mL p<0,01). Na twaalf maanden therapie was de HBsAg-waarde het sterkst gedaald en het laagst in groep C, p=0.01 (zie *Figuur 4*). HBeAg-seroconversie werd in geen van de patiënten in groep A bereikt, in 13% van de patiënten in groep B en in 8% van de patiënten in groep C. HBeAg-positieve patiënten hadden

Aanwijzingen voor de praktijk

Toepassingen voor kwantitatieve HBsAg-bepaling zijn:

1. **Lage HBV-DNA en lage QHBsAg duiden op immuuncontrole (inactief dragerschap) en kunnen minder frequent monitoren ondersteunen.**
2. **Onderscheid tussen laag- en hoog risico op reactivatie in de dragerfase.**
3. **QHBsAg-respons kan gebruikt worden voor het vroegtijdig stoppen van Peg-IFN behandeling bij zowel HBeAg als HBeAg-negatieve patiënten.**
4. **Voor NUC-behandelde patiënten dient de waarde van QHBsAg nog nader bepaald te worden.**

een snellere daling van het QHBsAg tijdens behandeling ten opzichte van HBeAg-negatieve patiënten, terwijl HBeAg-negatieve patiënten vaker een virologische respons (HBV-DNA ≤200 IU/mL) lieten zien (63% versus 37%). Bij twee patiënten (15%) in groep C werd tijdens de behandeling het HBsAg negatief terwijl geen van de patiënten in groep A en B dit bereikte. Uit de resultaten kon er worden geconstateerd dat hiv/HBV-coïnfectie-patiënten die behandeld waren met een tenofovir-bevattend regime een snellere daling in HBsAg-waarde hadden ten opzichte van patiënten met HBV-mono-infecties die waren behandeld met entecavir of tenofovir. De voorspellende waarde van een daling in de HBsAg-waarde voor anti-HBe seroconversie en HBsAg-verlies in hiv/HBV-coïnfecties is ook geobserveerd door anderen.[35]

Conclusie

De bepaling van het QHBsAg kan een toegevoegde waarde hebben in de diagnostiek bij het vaststellen van de fase van de infectie, de kans op reactivatie bij inactief dragerschap en als voorspeller van de resultaten van behandeling. Vooralsnog zijn de adviezen voor het gebruik van de QHBsAg bij monitoring van patiënten tijdens IFN-α medicatie het beste onderbouwd en worden zowel in de Nederlandse als de Europese richtlijn stopregels geadviseerd bij onvoldoende daling in het QHBsAg in de eerste drie maanden van de IFN-α therapie. Stopregels per genotype zijn nog niet ontwikkeld. Ook is het beloop van de QHBsAg en de betekenis ervan, in combinatie met het HBV-DNA-beloop, bij therapie met NUCs nog onduidelijk. Er zullen nog meer klinische validaties moeten worden gedaan in verschillende cohorten en bij verschillende genotypen en dat kan in de toekomst leiden tot start- en stop-indicaties voor verschillende therapieën in combinatie met andere parameters.

Referenties

1. Lee JM, Ahn SH. Quantification of HBsAg: Basic virology for clinical practice. World J Gastroenterol 2011;17(3):283–9.
2. Hadziyannis E. Quantification of HBsAg in serum: characteristics of the assays. Open access Hepatology 2013;1(1):1.
3. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 1965;191541-6.
4. Gitnick GL. Australia antigen and the revolution in hepatology. Calif Med 1972;116:28-34.
5. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. Cell 1986;47:451-60.
6. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, et al. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. J Hepatol 2009:51(3):581–92.
7. Deguchi M, Yamashita N, Kagita M, et al. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. J Virol Methods 2004;115(2):217-22.
8. Chen CH, Lee CM, Wang JH, et al. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004;16:1213-8.
9. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. Gastroenterology 2004;126:1750-8.
10. Kohmoto M, Enomoto M, Tamori A, et al. Quantitative detection of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. J Med Virol 2005;75:235-9.
11. Manesis EK, Hadziyannis ES, Angelopoulou OP, et al. Prediction of treatment-related HBsAg loss in HBeAg-negative chronic hepatitis B: a clue from serum HBsAg levels. Antivir Ther 2007;12:73-82.
12. Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, et al. Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. Hepatology 2009;49:1151-7.
13. Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F, et al. Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. Hepatology 2009;49:1141-50.
14. Wiegand J, Wedemeyer H, Finger A, et al. A decline in hepatitis B virus

surface antigen (HBsAg) predicts clearance, but does not correlate with quantitative HBeAg or HBV DNA levels. Antivir Ther 2008;13:547–54.

15. Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Asselah T, et al. HBsAg quantification: useful for monitoring natural history and treatment outcome. Liver Int 2014;34 Suppl 1:97–107.

16. Zacher BJ, Moriconi F, Bowden S, et al. Multicenter evaluation of the Elecsys hepatitis B surface antigen quantitative assay. Clin Vaccine Immunol 2011;18(11):1943-50.

17. Lee HJ, Kim SY, Lee SM, et al. Elecsys hepatitis B surface antigen quantitative assay: performance evaluation and correlation with hepatitis B virus DNA during 96 weeks of follow-up in chronic hepatitis B patients. Ann Lab Med 2012;32(6):420-5.

18. Wursthorn K, Jaroszewicz J, Zacher BJ, et al. Correlation between the Elecsys HBsAg II assay and the ARCHITECT assay for the quantification of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the serum. J Clin Virol 2011;50(4):292-6.

19. Park Y, Hong DJ, Shin S, et al. Performance evaluation of new automated hepatitis B viral markers in the clinical laboratory: two quantitative hepatitis B surface antigen assays and an HBV core-related antigen assay. Am J Clin Pathol 2012;137(5):770-7.

20. Tuaillon E, Mondain AM, Nagot N, et al. Comparison of serum HBsAg quantitation by four immunoassays, and relationships of HBsAg level with HBV replication and HBV genotypes. PloS One 2012;7(3):e32143.

21. Burdino E, Ruggiero T, Proietti A, et al. Quantification of hepatitis B surface antigen with the novel DiaSorin LIAISON XL Murex HBsAg Quant: correlation with the ARCHITECT quantitative assays. J Clin Virol 2014;60(4):341-6.

22. Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. J Hepatol 2010;52(4):514-22.

23. Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Laouénan C, et al. Prediction of disease reactivation in asymptomatic hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients using baseline serum measurements of HBsAg and HBV-DNA. J Clin Virol 2013;58:401–7.

24. Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, et al. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia. J Hepatol 2010;52(4):508-13.

25. Harkisoen S, Arends JE, Van Erpecum KJ, et al. Hepatitis B viral load and risk of HBV-related liver disease: from East to West? Ann Hepatol 2012;11(2):164-71.

26. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. Hepatology 2009;50(3):661-2.

27. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol 2012;57(1):167-85.

28. Nederlandse Vereniging van Maag-Darm-Leverartsen. Richtlijn behandeling van Chronische Hepatitis-B-virusinfectie. Nieuwe inzichten 2012. http://www.mdl.nl/uploads/240/1109/Richtlijn_HBV_nieuwe_inzichten_2012.pdf.

29. Chan HL, Wong VW, Chim AM, et al. Serum HBsAg quantification to predict response to peginterferon therapy of e antigen positive chronic hepatitis B. Aliment Pharmacol Ther 2010;32(11-12):1323-31.

30. Sonneveld MJ, Hansen BE, Piratvisuth T, et al. Response-guided peginterferon therapy in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels. Hepatology 2013;58(3):872-80.

31. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, et al. Prediction of sustained response to peginterferon alfa-2b for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using on-treatment hepatitis B surface antigen decline. Hepatology 2010;52(4):1251-7.

32. Heathcote EJ, Marcellin P, Buti M, et al. Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. Gastroenterology 2011 Jan;140(1):132-43.

33. Tseng TC, Kao JH. Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog. J Gastroenterol 2013;48(1):13-21.

34. Gish RG, Chang T-T, Lai C-L, et al. Quantitative hepatitis B surface antigen analysis in hepatitis B e antigen-positive nucleoside-naive patients treated with entecavir. Antivir Ther 2013; 18:691-8.

35. Matthews GV, Ali RJ, Avihingsanon A, et al. Quantitative HBsAg and HBeAg predict hepatitis B seroconversion after initiation of HAART in HIV-HBV coinfected individuals. PLoS One. 2013; 8(4). e61297.