

New marker for follow up of anti-HBV - retrospective study

Francesca Camilli¹, Marianna Saracino²

¹ U.O.S. Biologia Molecolare, Ospedale "A. Perrino", ASL Brindisi

² Università di Chieti

Key words: Chronic hepatitis B, Quantitative HbsAg, Sustained Immunological Control (SIC)

Nuovo marcatore per il follow up della terapia anti HBV - Indagine retrospettiva

SUMMARY

Hepatitis related to HBV manifests itself in many forms and can be treated with excellent results in the acute phase whereas, in the chronic phase, only a sustained immunological control (SIC) in time can be achieved. The current gold standard test for therapy is the quantitative HBV DNA which, by itself, does not allow an assessment of the SIC.

For the reason we did a retrospective study of 13 patients over a 19 month period during which we simultaneously evaluated both HBV DNA and the new marker: quantitative HbsAg; this test was carried out in house. The relationship that exists between the markers and which could provide the clinician with more information was evaluated in three types: **High similarity, Low similarity, No similarity** between the performance curves of the two markers probably connected by many types of therapeutic answers: sustained immunological control, low immunological control and no immunological control.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite B-HBV instaura nell'organismo ospite un'infezione persistente con differenti livelli di espressività clinica, biochimica e virologica influenzati, a loro volta, dall'equilibrio creatosi tra risposta immunitaria dell'ospite e replicazione virale.

A tal proposito, l'infezione da HBV è associata ad un ampio spettro di manifestazioni cliniche che vanno dall'epatite acuta e fulminante, a varie forme di epatite cronica, senza trascurare lo stato di portatore inattivo e le numerose infezioni occulte (4, 6, 10).

Per i portatori inattivi (definiti erroneamente portatori sani fino a qualche tempo fa) non è previsto altro che il monitoraggio periodico, mentre per i pazienti affetti gli attuali protocolli farmacologici prevedono terapie a base di *Interferon e/o analoghi nucleosidi(t)idici*.

L'attuale *gold standard* per il monitoraggio della terapia è rappresentato dalla quantificazione del HBV-DNA plasmatico, ma non sempre la non rivelabilità del genoma virale è indice di assenza di virus circolante, in quanto il cccDNA (*covalently closed circular DNA*) (9, 14) del virus tende comunque a persistere a lungo negli epatociti. Sarebbe pertanto estremamente utile poter disporre di altri marcatori indicativi dell'avvenuto controllo immunitario dell'ospite sull'infezione senza ricorrere alla biopsia epatica mal tollerata dai pazienti (13).

Studi recenti hanno documentato una correlazione diretta tra i livelli intracellulari di cccDNA e i livelli sierici dell'antigene di superficie durante le varie fasi dell'infezione (1), mentre non risulterebbe una correlazione analoga con i livelli plasmatici di HBV DNA (2, 3, 11, 15, 16).

La comparsa sul mercato del nuovo marcatore **HBsAg quantitativo** (5) e la pressione commerciale che propone il suo utilizzo, ci ha indotti a valutare tale marcatore su alcuni campioni plasmatici relativi a pazienti sottoposti a terapia, analizzati nel laboratorio di Biologia Molecolare dell'Ospedale "A. Perrino" ASL-Brindisi e conservati nella sieroteca del reparto.

Confrontando i due parametri (HbsAg Quantitativo e HBV DNA Quantitativo) contestualmente si potranno ricavare utili informazioni e valutare la qualità del controllo immunologico sostenuto (SIC) (12).

MATERIALE E METODI

Per lo studio sono stati presi in considerazione i 1965 campioni di plasma, processati nel periodo compreso da gennaio 2011 a luglio 2012, provenienti da pazienti affetti da vari tipi di epatite B arrivati al laboratorio con la richiesta di valutare e quantificare l'HBV-DNA, senza peraltro specifiche informazioni ne sulla tipologia di infezione ne sulla eventuale terapia utilizzata.

Il 57% dei pazienti è costituito da uomini e il 43% da donne (Figura I).

Corresponding author: Francesca Camilli

Cell.: 3494535227 - Fax: 0831 537616

E-mail: checcamilli@libero.it



Figura I.

Il range di età varia tra i 18 e i 90 anni. Analizzando il grafico della figura II sotto riportata si osserva come il maggior numero di pazienti ha un'età compresa fra i 50-65 anni.

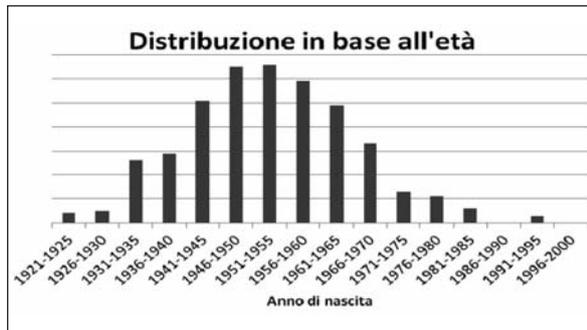


Figura II.

Dall'avvento della vaccinazione, divenuta obbligatoria in Italia con la Legge 165 del 27 maggio 1991, i casi di infezione da HBV sono notevolmente diminuiti.

Di questi 1965 campioni di plasma, sono stati selezionati quelli provenienti di 13 pazienti tutti affetti da epatite cronica, di cui avevamo dati sufficientemente numerosi.

Tali campioni, processati per la determinazione quantitativa dell'**HBV-DNA** con il kit commerciale **COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan® HBV v2.0** della ditta **Roche**, sono stati sottoposti al test per la determinazione dell'**HbsAg** utilizzando il Kit **VITROS® HBsAg ES Assay** della ditta **Ortho-Clinical Diagnostics** in uso in laboratorio, test sierologico qualitativo che sfrutta una tecnica **CLIA** (Immuno Assay Chemiluminescence) potenziata, rivelando anche 37 possibili mutazioni *escape*. La quantificazione dell'antigene è stata resa possibile utilizzando una curva di calibrazione esterna realizzata *in house* (Tabella 1, Figura III) che ci consente di interpretare il valore *index* (rapporto fra il segnale luminescente del campione e il valore di *cut off* del singolo campione) e valutarne la concentrazione. Tale curva è stata realizzata partendo da uno *standard* di **HBsAg** a titolo noto 101 UI/ml (cortesemente fornitoci dall'Istituto Superiore di Sanità), diluito scalarmente (1:10; 1:100; 1:1000) con **H₂O** distillata,

utilizzata anche per risospendere lo *standard* liofilo. L'analisi delle diluizioni scalari dello *standard* ha mostrato valori di *index* direttamente proporzionali alla concentrazione dell'antigene.

Tabella I.

PUNTI	CONCENTRAZIONE (UI/ml)	INDEX
C1	101 (dil. 1:400)	3600
C2	10.1 (dil. 1:10)	312
C3	1.01 (dil. 1:100)	32
C4	0.101 (dil. 1:1000)	2.98

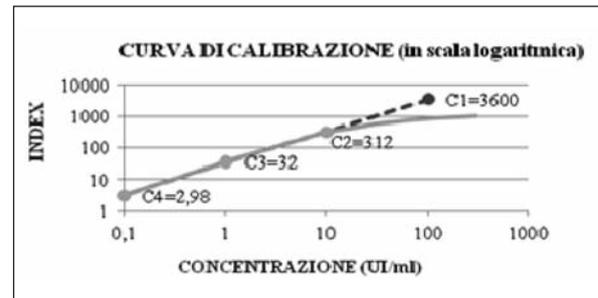


Figura III.

I campioni da analizzare, mediamente con un *index* molto elevato, sono stati diluiti 1:400 utilizzando un diluente specifico prelevato dal ES **HbsAg Confirmatory VITROS**, valutando tale diluizione come la più efficace (*).

Tale diluizione (1:400) è stata utilizzata per valutare un quarto punto della curva, relativo alla concentrazione *tq* (101 UI/mL); il valore così ottenuto, moltiplicato per 400 si è allineato con gli altri 3 punti della curva (Figura III) assicurandoci così anche la corretta valutazione dei campioni diluiti.

(*) Si ricorre semmai ad un diluizione più spinta nel caso di un valore *index* ancora troppo alto, oppure ad una più ridotta per quelli troppo bassi.

RISULTATI

Per ogni paziente valutato sono stati riportati i risultati dei due marcatori in una tabella ed in un grafico a doppia entrata. I grafici hanno un'asse delle "x" su cui sono riportate le date di prelievo e due assi "y": quello sulla sinistra, espresso in scala logaritmica, rappresenta la concentrazione plasmatica del **HBV-DNA** UI/mL, mentre quello sulla destra, in scala numerica, rappresenta la concentrazione plasmatica del **HbsAg** UI/mL.

La curva relativa all'**HBV-DNA** è espressa con linea nera, mentre quella del **HBsAg** quantitativo con linea grigia. In alcuni casi sono stati riportati valori di viremia più vecchi di cui non avevamo più il campione di plasma. Valori di **HBV-DNA** < 20 UI/ml (limite minimo di sensibilità del test in uso nel laboratorio) sono stati considerati negativi.

Di seguito sono riportati i 13 casi:

Paziente C.A. Analizzando il grafico di tale paziente, uomo di 44 anni per la prima volta testato nel nostro laboratorio nel gennaio del 2010, si osserva la non corrispondenza delle due variabili (HBV-DNA, HBsAg), difatti dopo una prima ed apparente correlazione si nota, nel campione di maggio 2012, come le due linee prendano direzioni diverse ed opposte.

Tabella 2

C.A. (08/03/1968)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
gen-10	1.00E+03	
set-10	1.00E+03	
gen-11	1.00E+03	2980
lug-11	1.00E+03	7952
ott-11	1.00E+04	8340
gen-12	1.00E+01	5388
mag-12	1.00E+01	4028
lug-12	1.00E+01	6448

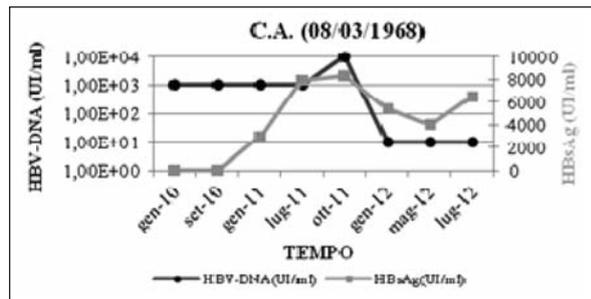


Figura IV.

Paziente C.G., maschio di 36 anni, presentatosi nel nostro laboratorio per la prima volta nel 2009 con valori molto alti di HBV-DNA. Dall'analisi della Figura V sotto riportata, ad un decremento del livello del HBV-DNA, si riscontra un innalzamento del livello del HBsAg. In questo caso, la persistenza dell'antigene di superficie, alla pari del caso precedentemente descritto, potrebbe essere associata ad una bassa probabilità di risposta immunologica sostenuta.

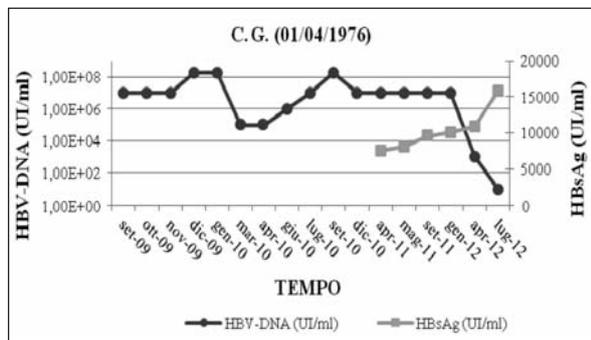


Figura V.

Tabella 3.

C. G. (01/04/1976)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
set-09	1.00E+07	
ott-09	1.00E+07	
nov-09	1.00E+07	
dic-09	1.80E+08	
gen-10	1.80E+08	
mar-10	1.00E+05	
apr-10	1.00E+05	
giu-10	1.00E+06	
lug-10	1.00E+07	
set-10	1.80E+08	
dic-10	1.00E+07	
apr-11	1.00E+07	
mag-11	1.00E+07	
set-11	1.00E+07	
gen-12	1.00E+07	10100
apr-12	1.00E+03	10876
lug-12	1.00E+01	15824

Paziente D.A. maschio di 66 anni. Dall'analisi del grafico relativo, si osserva come il repentino decremento della concentrazione di HBV-DNA in Aprile - Agosto 2011 non è corrisposto la diminuzione del HBsAg che, invece, sale in maniera graduale. Tale differente andamento potrebbe essere indice di una terapia non efficace, difatti nei primi mesi del 2012 si osserva un repentino innalzamento della carica virale fino a valori pari a 10^7 . Il paziente dall'inizio del 2012 è sottoposto a terapia con Tenofovir.

Tale farmaco determina un decremento di entrambi i *markers*, seppur quello dell'acido nucleico risulta esser più repentino rispetto a quello dell'antigene di superficie.

La lenta riduzione di HBsAg sarebbe indice di un maggiore controllo immunologico che potrebbe migliorare con il tempo.

Tabella 4.

D. A. (18/04/1946)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
apr-10	1.00E+04	
set-10	1.00E+07	
gen-11	1.00E+08	3704
apr-11	1.00E+04	8092
mag-11	1.00E+03	8859
ago-11	1.00E+02	9305
gen-12	1.00E+07	10454
mar-12	1.00E+06	11472
giu-12	1.00E+03	9920

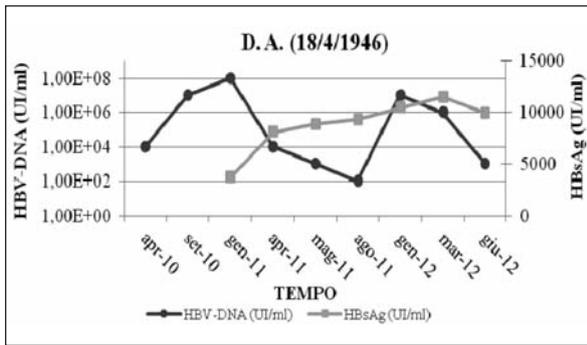


Figura VI.

Paziente D.P., femmina di 56 anni. Il grafico (Figura VII) mostra come i due markers hanno un andamento non simile, si osserva un decremento dell'acido nucleico ed un innalzamento del HBsAg.

Tabella 5.

D. P. (02/02/1956)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
feb-11	1.00E+05	3315
mag-11	1.00E+06	3626
giu-11	1.00E+06	4120
ago-11	1.00E+05	4897
ott-11	1.00E+04	5098
dic-11	1.00E+01	5196
mar-12	1.00E+01	5684
giu-12	1.00E+01	6306

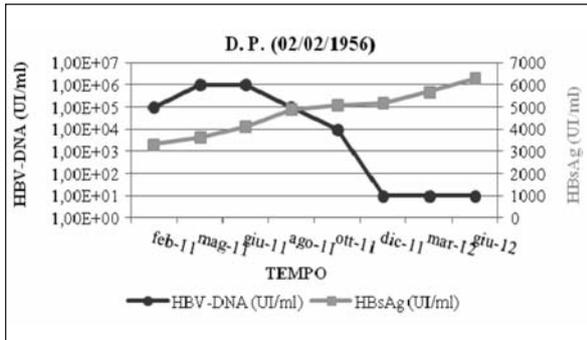


Figura VII.

Paziente L.P., maschio di 51 anni sottoposto a terapia con Entecavir, mostra un andamento simile a quello precedentemente descritto relativo al paziente D.P..

Si osserva una non correlazione degli andamenti delle curve dei due markers in particolare, mentre l'HBV-DNA decresce, L'HBsAg cresce.

Tabella 6.

L. P. (17/09/1961)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
ott-11	1.80E+08	3652
dic-11	1.00E+07	3877
mar-12	1.00E+05	4376
lug-12	1.00E+03	5052

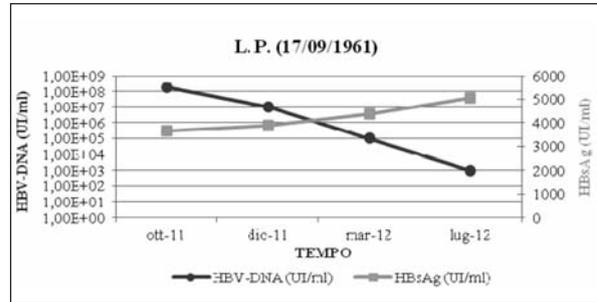


Figura VIII.

Paziente G.R. Il caso di G. R., maschio di 65 anni sottoposto da subito a terapia con Telbivudina, è un probabile esempio di paziente su cui il trattamento farmacologico utilizzato sta inducendo un efficace SIC; dal grafico sotto riportato si osserva una completa corrispondenza fra l'andamento nel tempo della curva relativa all'HBV-DNA e quello del HBsAg. Entrambi i markers sono caratterizzati da un repentino decremento.

Tabella 7.

G.R. (02/08/1932)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
apr-11	1.61E+08	12000
set-11	1.01E+05	7340
dic-11	7.60E+01	3598
apr-12	1.60E+01	680

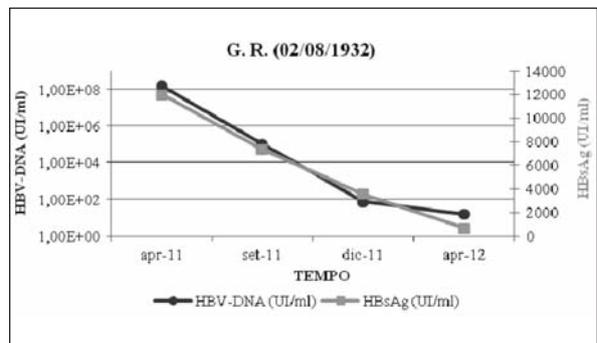


Figura IX.

Paziente I.F., maschio di 64 anni, ha una storia diagnostica risalente al 2006 (anno in cui per la prima volta è giunto in laboratorio un suo prelievo). Come si nota dal grafico sotto riportato, il trattamento farmacologico determina inizialmente un lieve decremento della carica virale fino a Gennaio 2011, mese in cui si ha una sua repentina risalita. Da Febbraio 2011 fino a luglio si osserva un decremento dei livelli di entrambi i *markers* (HBV-DNA, HbsAg) dovuti ad un cambio di terapia.

Tabella 8.

I. F. (21/04/1943)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
ott-06	1.00E+04	
feb-07	1.00E+03	
feb-08	1.00E+03	
lug-08	1.00E+04	
feb-09	1.00E+02	
giu-09	1.00E+02	
set-09	1.00E+02	
gen-10	1.00E+02	
gen-11	1.00E+06	5712
mar-11	1.00E+05	4544
mag-11	1.00E+05	4578
set-11	1.00E+02	3196
gen-12	1.00E+01	2789
apr-12	1.00E+00	2500

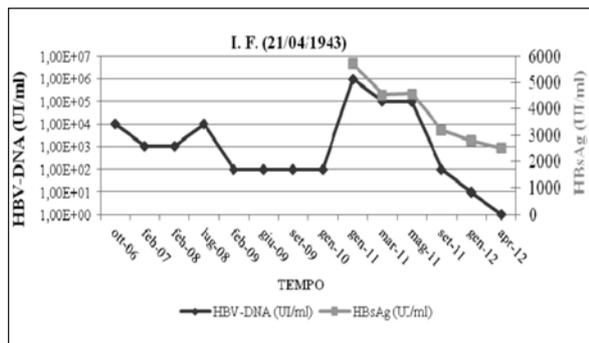


Figura X.

Paziente L.G. Il grafico (Figura XI) del paziente L.G. mostra un andamento simile a quello del paziente (I. F.) precedentemente descritto. Il trattamento farmacologico a cui è sottoposto determina un riduzione nel tempo di entrambi i *markers*. In particolare, l'HBV-DNA ha un andamento sinusoidale per poi azzerarsi nel luglio del 2012, mentre il decremento dell'HBsAg risulta esser meno repentino.

Tabella 9.

L. G. (08/04/1965)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
mag-02	1.00E+04	
nov-03	1.00E+06	
gen-05	1.00E+06	
apr-05	1.00E+04	
ott-05	1.00E+03	
ago-07	1.00E+06	
ott-07	1.00E+04	
giu-11	1.00E+04	1009
lug-11	1.00E+02	872
nov-11	6.00E+01	674
apr-12	1.00E+04	611
lug-12	1.00E+00	666

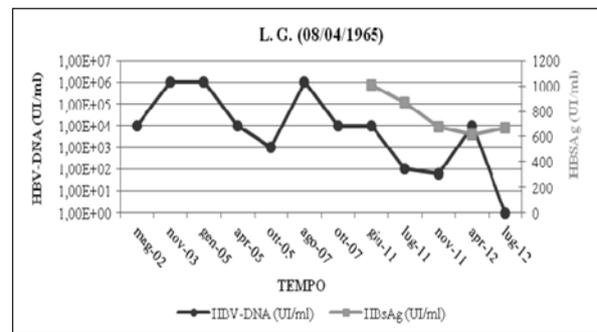


Figura XI.

Paziente P.L. femmina di 58 anni i cui risultati hanno mostrato (Figura XII) una persistenza nel tempo di alti livelli di HBsAg, a differenza del HBV-DNA la cui concentrazione nel tempo decresce repentinamente.

Tabella 10.

P. L. (15/03/1954)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
ott-11	1.00E+06	6358
gen-12	1.00E+06	5775
feb-12	1.00E+04	5643
set-12	1.50E+01	5490

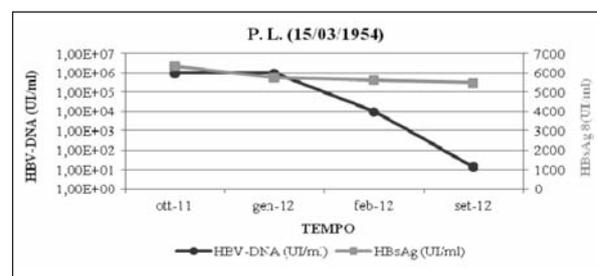


Figura XII.

Paziente A.C. Il grafico del paziente A.C., donna di 67 anni, è simile a quello precedentemente descritto del paziente P.L. Anche in questo caso la

terapia in uso, nonostante determini una netta riduzione nel tempo dei livelli di HBV-DNA, non ha alcun effetto sul HBsAg che, al contrario, aumenta.

Tabella 11.

A. C. (18/01/1945)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
set-09	1.00E+06	
nov-10	2.50E+06	
nov-11	1.80E+06	7136
gen-12	1.80E+04	7516
mar-12	4.73E+03	8248
giu-12	6.00E+01	8832

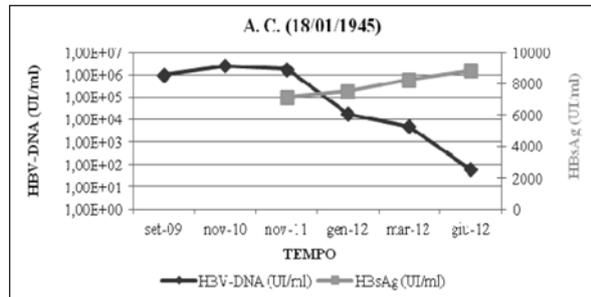


Figura XIII.

Paziente P.A. Il grafico del paziente P.A., maschio di 68 anni, è quello tipico di un paziente in terapia con esito positivo, in quanto vi è grande corrispondenza fra i livelli di entrambi i markers. La rapida riduzione dell'HBsAg potrebbe essere indice di un'alta probabilità di controllo immunologico sostenuto.

Tabella 12.

P.A. (03/11/1944)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
gen-11	1.00E+03	2538
giu-11	1.00E+03	2952
ott-11	1.00E+05	3195
dic-11	1.00E+04	2076
feb-12	1.00E+02	1360
mag-12	5.00E+01	388
ago-12	1.00E+01	315

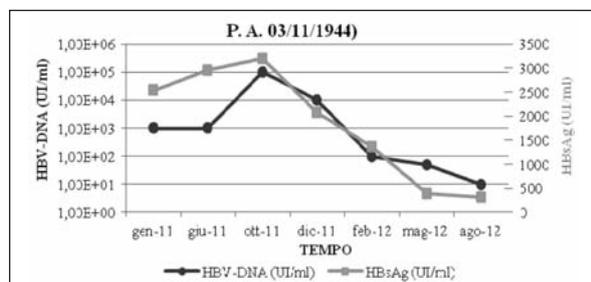


Figura XIV.

Paziente S.V. Analizzando il grafico del paziente S.V. (Figura XV), maschio di 52 anni, si osserva un apparente calo di entrambi i markers, nonostante i valori di HBsAg QT rimangano sempre molto alti (nell'ordine di 10⁴).

L'andamento decrescente di entrambi i marcatori (HBV-DNA e HBsAg) indicherebbe che la terapia in uso sia efficace, ma il persistere di alte concentrazioni plasmatiche di HBsAg lo escluderebbe.

Tabella 13.

S.V. (07/02/1960)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
dic-10	1.80E+08	
gen-11	1.00E+06	74982
mar-11	1.00E+05	70000
apr-11	1.00E+05	66780
giu-11	1.00E+04	65650
set-11	1.00E+04	56346
dic-11	1.00E+03	45769
feb-12	1.00E+03	42083
mag-12	1.00E+03	38828
lug-12	1.00E+02	25024

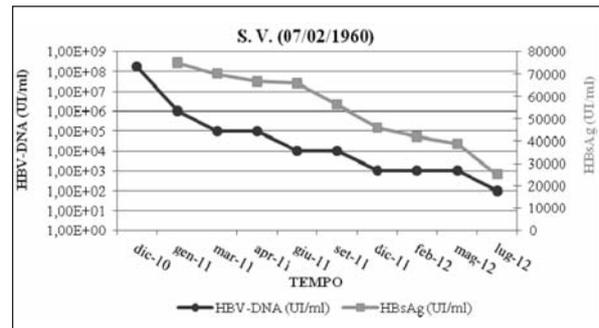


Figura XV.

Paziente R.R. L'analisi dei dati (Tabella 14 e Figura XVI) relativi alle concentrazioni plasmatiche sia del HBsAg QT che del HBV-DNA del paziente R.R., femmina di 57 anni, va fatta con una certa attenzione: si nota un andamento decrescente dell'acido nucleico in valori logaritmici e un'apparente variabilità nel tempo della concentrazione del HBsAg QT.

Quest'ultima in realtà presenta valori più che accettabili infatti, le concentrazioni di HBsAg sono piuttosto basse sin dall'inizio, anche rispetto ai valori riscontrati negli altri pazienti analizzati. Tutto ciò porta a presupporre che la terapia in atto stia avendo successo e, pertanto, possa indurre un controllo immunologico sostenuto nel tempo.

Tabella 14.

R. R. (05/10/1957)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
feb-08	1.00E+04	202
giu-11	1.00E+05	172
ott-11	1.00E+04	368
mar-12	1.00E+01	156
mag-12	1.00E+01	236

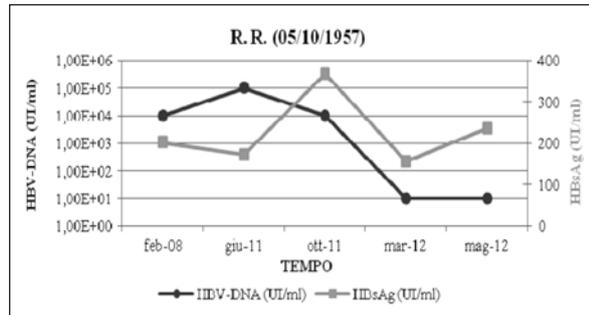


Figura XVI.

DISCUSSIONI

Nonostante ad oggi siano disponibili efficaci presidi profilattici e terapeutici, il virus dell'epatite B costituisce ancora un grave problema sanitario a livello mondiale, perché 2 miliardi di persone ne sono infette in tutto il mondo e di queste 350 milioni hanno sviluppato un'infezione cronica che, se non precocemente trattata potrebbe evolvere in cirrosi epatica, scompenso epatico fino a carcinoma epatocellulare (HCC).

Purtroppo i casi conclamati di Epatite B cronica sono notevolmente sottostimati rispetto quelli reali e di questi solo una piccola percentuale risulta essere in trattamento.

L'obiettivo principale della terapia farmacologica non è l'eradicazione dell'infezione, ma nei soggetti affetti da epatite cronica B è quello di arrestare la progressione del danno epatico migliorando la qualità della vita dei pazienti, attraverso una soppressione massiva della replicazione del HBV. Sembra quindi auspicabile, anche dai dati riportati in questo studio, l'utilizzo del nuovo marcatore HbsAg quantitativo in quanto promette utili informazioni sulla validità ed efficacia della terapia (7).

Dall'analisi dei grafici riportati nel paragrafo precedente si possono riassumere tre diverse tipologie di relazioni che intercorrono fra i due markers nel corso della terapia:

Alta analogia di andamento delle due curve: si osserva nel tempo un repentino e contemporaneo calo della concentrazione plasmatica di entrambi i marcatori (HBV-DNA ed HBsAg Quantitativo). Il calo di HBsAg Quantitativo fino a livelli molto

bassi può significare un'alta probabilità di controllo immunologico sostenuto (SIC). Questo è il caso di tre dei tredici pazienti: G.R. (1947), P.A. (1944), e R.R. (1957).

NOTA: Lo stesso andamento fra le due curve si nota sia nei casi di Epatite acuta trattata tempestivamente, sia in quelli di riattivazione del virus (4), come nel caso del paziente A.F. (09.07.1940) da noi seguito (vedi Figura XVII). La riattivazione, provocata da una terapia oncologica immunosoppressiva, è stata trattata tempestivamente, come un'epatite acuta, ed alla fine si è registrata una completa sierconversione.

Tabella 15.

A. F. (09/07/1940)		
TEMPO	HBV-DNA (UI/ml)	HBsAg (UI/ml)
mag-10	2.05E+02	
feb-11	1.70E+08	
mar-11	2.02E+04	
apr-11	3.85E+02	130
lug-11	1.00E+00	0.16
gen-12	1.50E+01	0
apr-12	1.00E+00	0

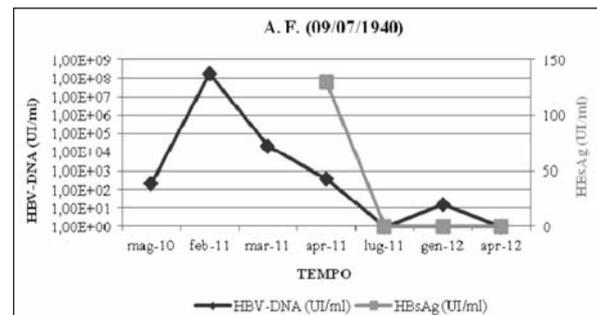


Figura XVII.

Ridotta Analogia di andamento delle due curve: in altri pazienti, come per esempio nei casi di D.A. (1946) e I.F. (1943), si osserva una lenta riduzione dei livelli plasmatici di HBsAg nonostante il calo repentino della concentrazione plasmatica di HBV-DNA. Tale situazione ci fa presupporre che la terapia, pur essendo efficace, abbia bisogno di tempi più lunghi per indurre una netta riduzione del HBsAg Quantitativo con conseguente controllo immunologico (SIC).

Assenza di analogia nell'andamento delle due curve. Diverso è il caso in cui i pazienti apparentemente risultano responsivi alla terapia, rivelando una riduzione dei livelli di HBV-DNA nel plasma, ma in realtà presentano livelli di HBsAg persistenti o addirittura in aumento nel tempo. In tali soggetti vi è, quindi, una bassa probabilità di controllo immunologico sostenuto, ed esiste il rischio

di aumento della carica virale una volta sospesa la terapia. Tale condizione è stata riscontrata nella maggior parte dei casi analizzati: C.A. (1968), C.G. (1976), D.P. (1956), L.P. (1961), L.G. (1965), P.L. (1954), S.V. (1960), A.C. (1945).

L'analisi di questi due marcatori e il loro andamento nel tempo consentirebbe al clinico di apportare delle modifiche alla terapia a cui il paziente è sottoposto al fine di arrestare il danno epatico.

Nonostante ciò, tutt'oggi è ancora molto difficile ottenere, nei pazienti affetti da epatite B cronica, se pur trattati con terapia, un completo controllo immunologico che si mantenga nel tempo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ben Slama N, Ahmed SN, Zoulim F. HBsAg quantification: virological significance. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010; 34 (Suppl 2): S112-8.
2. Bonino F, Piratvisuth T, Brunetto MR, Liaw YF. Diagnostic markers of chronic hepatitis B infection and disease. *Antivir Ther.* 2010; 15 (Suppl 3): 35-44.
3. Brunetto MR. A new role for an old marker, HBsAg. *J Hepatol.* Apr 2010; 52 (4): 475-7.
4. Camilli F, Zollino AR, Bove P, Gatto V, Cucci F. Casi di riattivazione di epatite B in pazienti HBsAg negativi. *Blood Trasfusione*, 2012; 10 (Suppl. 1): S226.
5. Camilli F, Fumarola I, Venera C, Greco R, Cucci F. HBsAg QUANTITATIVO: nuovo marcatore nel follow up dell'epatite. *Blood Trasfusione.* 2012; 10 (Suppl. 1): S302-3.
6. Carosi G, Pauluzzi S. in *Malattie infettive* Piccin, 2007; 536-40.
7. Chan HL, Wong VW, Tse AM, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol.* Dec 2007; 5: 1462-8.
8. Chen CH, Lee CM, Wang JH, Tung HD, Hung CH, Lu SN. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carrier. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 16: 1213-8.
9. Mason WS, Aldrich C, Summers J, Taylor JM. Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus strand DNA. *PNAS* 1982; 79: 3997-4001.
10. Moroni M, Esposito R, De Lalla F. in *Malattie infettive* Elsevier Masson, 2008; 585-6.
11. Ozaras R, Tabak F, Tahan V, et al. Correlation of quantitative assay of HBsAg and HBV DNA levels during chronic HBV treatment. *Dig Dis Sci.* 2008; 53: 2995-8.
12. Su TH, Hsu CS, Chen CL, et al. Serum hepatitis B surface antigen concentration correlates with HBV DNA level in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther.* 2010; 15: 1133-9.
13. Viganò M, Lampertico P. Clinical implications of HBsAg Quantification in Patients with Chronic Hepatitis B. *Saudi J Gastroenterol.* Mar-Apr 2012; 18: 81-6.
14. Weiser B, Ganem D, Seeger C, Varmus HE. Closed circular viral DNA and asymmetrical heterogeneous forms in livers from animals infected with ground squirrel hepatitis virus. *J Virol.* 1983; 48: 1-9.
15. 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. *Gastroenterol.* 2004; 126: 1750-8.
16. Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2006; 44: 675-84.