

РОЛЯ НА HBsAg В МОНИТОРИРАНЕТО АНТИВИРУСНАТА ТЕРАПИЯ ПРИ ХРОНИЧЕН ХЕПАТИТ В

През последните 10 години количественото измерване в серума на хепатит В вирусния повърхностен антиген (HBsAg) предизвика голям ентузиазъм, свързан както с възможността за предсказване на болестната активност, така и за мониториране на терапевтичния отговор при пациенти с хроничен хепатит В (CHB). Стандартната единица за измерването на нивото на HBsAg е IU/ml и в наши дни е почти задължително изследването поради разработването на нови противовирусни терапевтични стратегии, насочени към клиърънс на HBsAg, т.е. към функционален контрол („functional cure“) на CHB. Значително напреднаха познанията ни на молекулярно ниво и в частност за ролята на ковалентно свързаната циркулярна ДНК (ccc DNA) и интегрираната хепатит В вирусна ДНК (HBV DNA).

Молекулярни основи на HBsAg продукцията

HBV кодира продукцията на три вида HBsAg протеини, оформящи вирусната обвивка: малки (S-HBsAg); средни (M-HBsAg); големи (L-HBsAg)^[16]. Те се транслират от две суб-геномни матрични рибонуклеинови киселини (mRNA) транскрипти, а именно – pre-S1 mRNA и pre-S2/S mRNA на HBV. Повърхностните протеини се произвеждат в ендоплазмения ретикулум (ER) за разлика от репликацията на вирусния геном, която се случва в цитозола на клетката чрез обратна транскрипция на прегеномната РНК (pgRNA) в ДНК. Секреторният път на HBsAg (в ER) е различен от този на вирусната DNA репликацията и могат да се разглеждат като отделни, макар и взаимно свързани процеси в инфектирания хепатоцит^[22]. Зрелият HBV вирион е с диаметър около 42 nm, съдържа преимуществено S-проте-

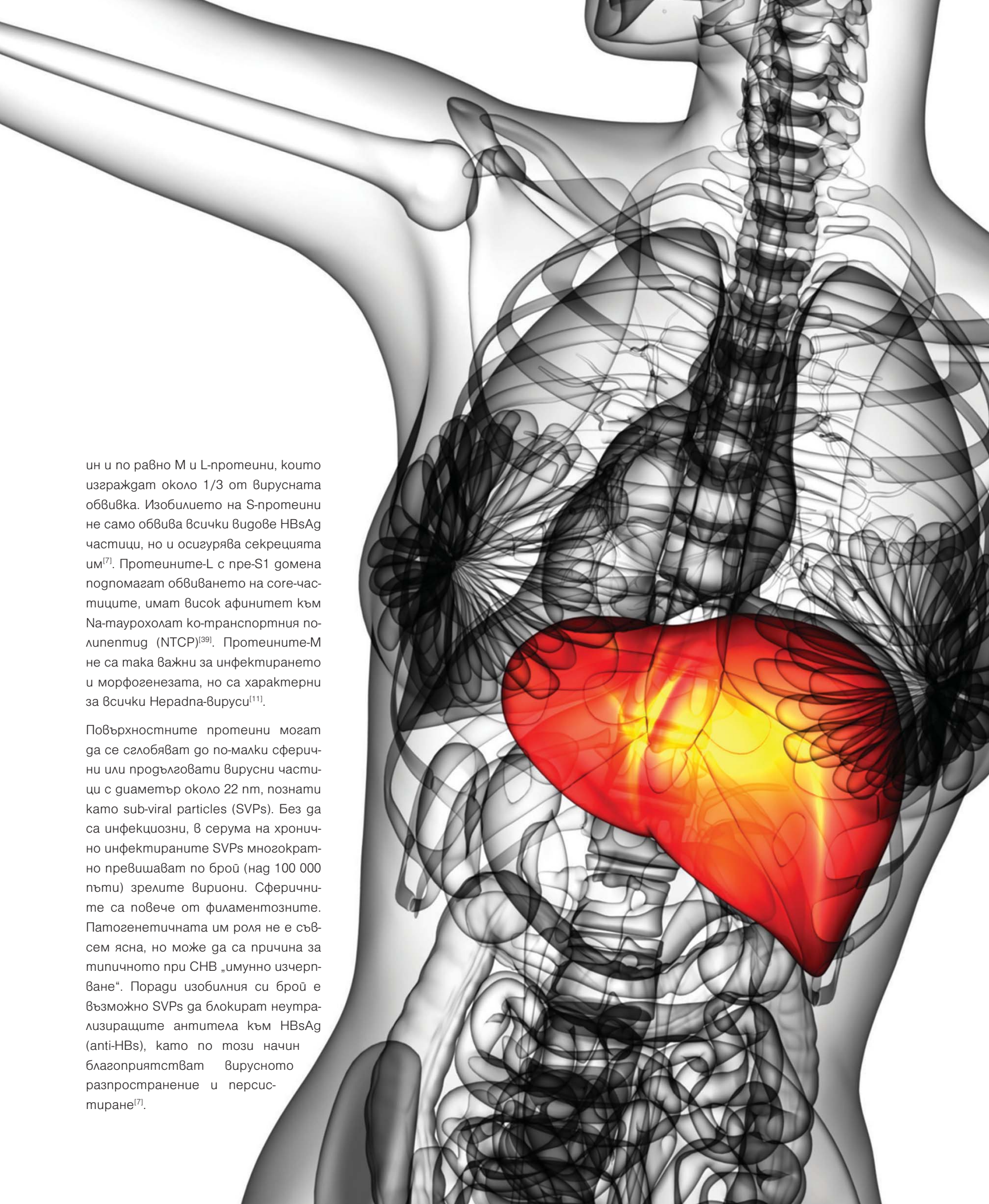


г-р Вера
Йорданова,
г-р Йордан Попов,
г-р Нонка Юркова,
г-р Милена
Перухова

Клиника по вътрешни
болести, УБ „Лозенец“, гр. София

Тези постижения хвърлиха нова светлина върху интерпретацията на HBsAg нивата в различните фази на хроничния хепатит В. Количественото изследване на HBsAg ни позволява да разграничим фазата на имунния толеранс от тази на имунния клиърънс при HBeAg (+) пациенти и да предскажем неактивната болест и спонтанния клиърънс на HBsAg при HBeAg (-) пациенти. Измерването на нивата на HBsAg е от първостепенно значение за индивидуализиране на терапията с пегилиран интерферон

(PegIFN) и е от ключово значение при вземането на решение за ранно спиране на PegIFN при нереспондерите. Драматичната редукция на HBsAg в хода на терапията с нуклеотидни аналози (NAs) разграничава респондерите и може да се последва от клиърънс на HBsAg, който от своя страна позволява безопасно спиране на терапията. С навлизането на нови анти-HBV медикаменти се очаква измерването на HBsAg да нараства по важност като инструмент за мониториране и насочване на противовирусната терапия при CHB.



ин и по равно M и L-протеини, които изграждат около 1/3 от вирусната обвивка. Изобилието на S-протеини не само обвива всички видове HBsAg частици, но и осигурява секрецията им^[7]. Протеините-L с пре-S1 домена подпомагат обвиването на соге-частиците, имат висок афинитет към Na-таурохолат ко-транспортния полипептид (NTCP)^[39]. Протеините-M не са така важни за инфектирането и морфогенезата, но са характерни за всички Нерадна-вируси^[11].

Повърхностните протеини могат да се съгледват до по-малки сферични или продълговати вирусни частици с диаметър около 22 nm, познати като sub-viral particles (SVPs). Без да са инфекциозни, в серума на хронично инфектираните SVPs многократно превишават по брой (над 100 000 пъти) зрелите вириони. Сферичните са повече от филаментозните. Патогенетичната им роля не е съвсем ясна, но може да са причина за типичното при CHB „имунно изчерпване“. Поради изобилния си брой е възможно SVPs да блокират неутрализиращите антитела към HBsAg (anti-HBs), като по този начин благоприятстват вирусното разпространение и персистиране^[7].

Роля на епизомната HBV DNA

Вирусът на хепатит В е DNA вирус, който се реплицира чрез обратна транскрипция и процесът се задвижва от транскрипционната матрица, сссDNA, разположена в ядрото на хепатоцита под формата на мини-хромозома^[2]. Транскрипцията на тази мини-хромозома генерира всички матрични РНКи (mRNAs), необходими за HBV-репликацията, включително и за продукцията на SVPs. HBsAg може също така да бъде произведен от интегрираната в човешкия геном HBV DNA. Въпреки че вирусната интеграция не е необходима за репликацията на вируса, интеграцията на HBV DNA се случва нелегално чрез рекомбинантни механизми с помощта на човешки ензими, действащи на двойно-верижната линейна (DSL) DNA форма на вируса^[1]. Не целият вирусен геном се интегрира, а само някои части от него, и това обикновено са регионите DR-1/DR-2^[12]. Предпочетените за интеграция региони не могат да бъдат матрица за цялостна вирусна репликация, тъй като не е наличен целият геном, но могат да произвеждат HBsAg. Следователно, HBsAg има два източника: от сссDNA и от интегрираната DNA. Това е от значение не само за дефиниране на терапевтичните крайни точки, като functional cure и complete cure^[30], но също и за опита да се прави корелация между нивото на HBsAg в серума и някои репликативни маркери в черния дроб. Донякъде това обяснява защо количественото определяне на HBsAg не е перфектен биомаркер за интрахепаталната сссDNA.

Естествен ход на HBV инфекцията

Продукцията на HBsAg се влияе от генотипа и подгенотипа на вируса. Серумното ниво на HBsAg е по-високо при пациенти с генотип А (А2 и А1) в сравнение с генотип В, С инфектирани^[36]. Наличието на preS/S мутанти корелира негативно с продукцията на HBsAg в серума^[29] и не на последно място, количеството и качеството на HBsAg продукцията се модулира от взаимодействието между вируса и имунната система на гостоприемника, като серумното ниво на HBsAg отразява имунния контрол върху HBV инфекцията: колкото по-силен е контролът, толкова по-нисък е HBsAg^[17]. Количеството на циркулиращия в серума HBsAg е индиректен маркер за имунологичния контрол върху HBV инфекцията, независимо от нивото на HBV DNA в серума и двата маркера трябва да се интерпретират заедно.

HBsAg при остра HBV инфекция

За разлика от хроничната HBV-инфекция при острата инфекция промените в HBsAg строго корелират с намалението на HBV DNA^[17], поради което измерването на HBsAg е полезно в мониториране и предсказване хода на острия хепатит В, както се съобщава в публикации още през 70-те г.^[13].

HBsAg при нелекувани пациенти

При нелекувани пациенти нивото на HBsAg дава допълнителна информация относно активността на болестта и прогнозата, особено при HBeAg (-) пациенти с ниско ниво на HBV DNA. Смята се, че при HBeAg (+) пациенти HBsAg предоминантно произлиза от сссDNA, докато при HBeAg (-) пациенти HBsAg произлиза пре-

гимно от интегрираната HBV DNA.

При HBeAg (+) пациенти количественото определяне на HBsAg може да диференцира фазата на имуен толеранс от тази на имуен клиърънс. При HBeAg (+) пациенти серумните нива на HBV DNA и HBsAg обикновено са високи. Ключовите въпроси обаче са тежестта на фиброзата и некроинфламацията в черния дроб, които именно определят необходимостта от антивирусна терапия, както и риска от хепатоцелуларен карцином (HCC). Въпреки че по-ниското ниво на HBsAg се асоциира с имуен клиърънс и по-напреднала фиброза, клиничната му стойност е ограничена и не може да замени биохимичната и хистологична оценка^[28].

При HBeAg (-) пациенти количественото определяне на HBsAg може да разграничи HBeAg (-) фаза на CHB от тази на неактивна HBV-инфекция (или inactive carrier; IC), което е изключително важно. HBeAg (-) CHB понякога се представя с флукуиращо ниски ALT, HBV DNA и временни ремисии, имитиращи неактивна HBV-инфекция^[5].

При пациентите с неактивна HBV-инфекция и генотип D комбинацията от HBV DNA трайно <2000 IU/ml и HBsAg <1000 IU/ml, разграничава неактивните носители от тези с активен CHB с диагностична точност от 94.3% и PPV от 87.9%^[6]. При генотип В и С диагностичната точност е 78%, а PPV – 83% според REVEAL-cohort study^[23]. Много ниско серумно ниво HBsAg <100 IU/ml идентифицира неактивните носители с висока склонност за спонтанна загуба на HBsAg.

Пациентите HBeAg (-) с HBV DNA >2000 IU/ml и напреднала фиброза имат висок риск от болестна про-

гресия и НСС; показани са антивирусна терапия и HBsAg има ограничена роля в решението за терапия.

При HBeAg (-) пациенти не се установява съществена корелация между HBsAg в серума и фиброзата^[29]. Няколко проучвания показват тенденция за по-ниски нива на HBsAg при цироза, вероятно поради преобладаването на вирусни preS/S варианти, селектирани по време на продължаваща дълго време фаза на имунен клирънс^[29,6].

HBsAg в мониторирането на терапия с пегилиран интерферон алфа (PegIFN α)

HBsAg в серума е най-важният предиктор за терапевтичен отговор към PegIFN α , независимо че се влияе от HBV генотипа. Нивото на HBsAg идентифицира нереспондерите и има силата на стопиращо правило.

Терапията с PegIFN α относително рядко води до траен отговор, свързана е с нежелани странични ефекти, поради което трябва да се индивидуализира, т.е. да се прилага при пациенти с най-високи шансове за отговор и да се спре максимално рано ако не е ефективна. Въпреки че по-ниските нива на HBsAg се асоциират с по-добър отговор при терапевтично наивни пациенти, изходното ниво на HBsAg има ограничена роля в селекцията на пациентите за терапия и е добавка към някои други параметри, като HBV генотип, HBV DNA и ALT. От друга страна, на 12^{ма} и 24^{ма} седмица от терапията нивото на HBsAg в серума има висока негативна предсказваща стойност (NPV)

и е ценен инструмент за идентифициране на нереспондерите. При пациентите с ниско или умерено високо ниво на HBsAg по време на терапията няма убедителни доказателства в полза на удължаване на терапията с PegIFN или добавяне на NA^[28].

Проучванията показват, че промените в серумните нива на HBsAg по време на терапията с PegIFN α отразяват промените в нивата както на интрахепаталната cccDNA, така и на интрахепаталния HBsAg. Следователно, намалението на HBsAg в серума се асоциира с индукция на ефективен анти-HBV имунен отговор^[38].

HBeAg (+) пациенти

PegIFN α индуцира съществено намаление на HBsAg в серума, което се задържа и след спиране на лечението^[19]. Степента на намалението е свързана с активен имунен отговор преди терапията, което предполага повишен ALT в серума и повишен IP-10 (индуциран от IFN гамма протеин 10; CXCL-10)^[33], наличие само на див тип HBV вирус преди терапията с PegIFN α ^[35]. От значение е и HBV генотипът. Пациентите с генотип А постигат най-изразено намаление на HBsAg, а тези с генотип D – най-ниското^[34].

Намалението на HBsAg в серума по време на терапията с PegIFN α настъпва почти изцяло при пациентите, които отговарят на терапията, поради което мониторирането на HBsAg нивото е ценно за разграничаване на респондерите от нереспондерите.

Нов мета-анализ потвърждава отличната предсказваща стойност на HBsAg при пациентите с HBeAg (+) CHB на лечение с PegIFN α . Стопиращите правила са съобразени с

генотипа и се прилагат още на 12^{ма} седмица от терапията. При пациентите, инфектирани с HBV генотип А или D, лечението трябва да се спре, ако няма намаление на HBsAg на 12^{ма} седмица от терапията^[34]; също така, изключително рядко е да има отговор, ако HBsAg >20,000 IU/ml при пациенти с HBV генотип В или С^[19]. На 24^{ма} седмица PegIFN α трябва да се спре при всички пациенти с HBsAg >20,000 IU/ml, независимо от HBV генотипа. Освен като стопиращо правило, нивото на HBsAg също се прилага за разпознаване на пациентите с големи шансове за успех. Ако на седмица 12^{ма} или 24^{ма} нивото на HBsAg е ниско (≤ 1500 IU/ml), това се асоциира с висок шанс за успех (>50%) и важи за всички основни генотипове.

HBeAg (-) пациенти

За разлика от HBeAg (+) пациенти, много от HBeAg (-) постигат неоткриваема HBV DNA по време на терапията, но релапсират след спирането на PegIFN α ^[10]. При тях изследването на HBsAg се оказва особено важно, тъй като е единственият количествен маркер при постигнатата HBV DNA супресия^[4]. Подобно на HBeAg (+) пациенти, HBeAg (-), които постигат съществено намаление на HBsAg нивото по време на лечение, по-често постигат и траен отговор^[26]. За предсказването на терапевтичен отговор освен нивото на HBsAg се използва и HBV DNA. Ако пациентите с генотип D не постигнат намаление на HBsAg на седмица 12^{ма} и HBV DNA не намалее с >2 log IU/ml, те нямат шанс за траен отговор (HBV DNA <2000 IU/ml и нормален ALT на 6^{ти} месец след спиране на терапията). Това стопиращо правило има NPV от 100% и позволява на 20% от пациентите да спрат ненуж-

ното лечение още на 12^{ма} седмица.

При пациентите с генотип В или С не съществува ясно стопиращо правило и съвсем оскъдни данни са налични за пациентите с генотип А и Е^[3], което повдига въпроса дали предсказващите правила не трябва да са HBV генотипно специфични, особено при пациенти с генотип А или С.

HBsAg в мониторирането на терапия с nucleos(t)ide analogue NAs

Мониториранието нивото на HBsAg по време на терапия с NAs може да определи продължителността на терапията, необходима за достигане на HBsAg сероконверсия и да предскаже трайния отговор след спиране на терапията.

Намалението на HBsAg в хода на терапията с NAs е значително по-малко в сравнение с терапията с PegIFNα, въпреки че NAs оказват по-мощна HBV DNA супресия^[25].

NAs подтискат само обратната транскрипция на pgRNA без да действат директно върху cccDNA. Следователно, не се очакват промени на транскрипционно ниво и в частност върху секреторния път на HBsAg. Интерферонът, за разлика от NAs, оказва както директен антивирусен ефект, така и имуномедиран. Имулната модулация от IFN е причина за граматичното намаление на HBsAg продукцията и секрецията. На базата на HBsAg кинетиката някои автори са изчислили, че са необходими средно около 30 години и повече

за клиърънс на HBsAg при лечение с NA^[41]. Намалението на HBsAg е по-изразено при HBeAg (+) пациенти в сравнение с HBeAg (-) пациенти^[40]. По-бързото намаление при HBeAg (+) пациенти, особено през първата година от терапията с NA^[32], може да се обясни с ефекта на NA върху HBV DNA съдържащите вируси. Освен това, HBeAg (-) пациенти вероятно имат по-голямо количество интегрирана HBV DNA, която също е източник на HBsAg продукция. Въпреки че намалението на HBsAg е съвсем бавно, има индивидуални различия. По-съществени намаления на HBsAg се наблюдават при по-високи предтерапевтични стойности на ALT^[41] или на IP-10[СХСL-10]^[18], което потвърждава схващането, че за загубата на HBsAg и клиърънса на HBV е необходим имунен отговор. Няма доказателства за преимуществата на някои NA пред други или комбинация от тях по отношение на HBsAg кинетиката^[40,18].

Ключовият маркер в мониториране ефикасността и придържането към терапията с NA е HBV DNA. Въпреки че една малка част от пациентите имат много бързо намаление на HBsAg нивото през първата година от терапията с NA, повечето HBeAg (+) пациенти имат съвсем бавно намаление на HBsAg нивото. Мониторирането на нивото на HBsAg дава представа колко продължително трябва да бъде лечението с NA, за да се постигне клиърънс на HBsAg, а това е рядко събитие^[9]. При лечение с Tenofovir при HBeAg (+) пациенти, например намалението на HBsAg с повече от 1 log на седмица 12^{ма} или 24^{ма}, предсказва загуба на HBsAg с PPV над 45% и NPV от 97%^[27].

Нивото на HBsAg е интересен маркер в предсказването на HBV реакти-

вация или траен отговор след спиране на терапията с NA. Ниво на HBsAg <100 IU/ml изглежда предсказва траен отговор, но така или иначе няма точна предсказваща стойност^[3].

Интерпретацията на HBsAg кинетиката е по-трудна при HBeAg (-) пациенти^[21]. Сравнени с HBeAg (+) пациентите, HBeAg (-) показват различна кинетика на HBsAg към цитокини (като лечение с IFN) и не-цитолитични имунни отговори по време на естествения ход на HBV инфекцията или по време на терапия с NA. Освен това, някои HBeAg (-) пациенти с ранно намаление на HBsAg в хода на NAs терапия, може просто да са навлезли в друга фаза на HBV-инфекцията, например от имунен клиърънс във фаза на HBeAg (-) хепатит^[18] и затова да е намалено нивото на HBsAg, т.е. да се касае за естествено в хода на HBV-инфекцията намаление на HBsAg.

Нивото на HBsAg при HBeAg (-) пациенти е полезно при вземане на решение дали да се спре терапията. Анализ на ретроспективни проучвания показва, че някои пациенти с намаляващи или ниски нива на HBsAg (<100 IU/ml) биха могли да поддържат контрол върху HBV след спиране на дълготрайна NAs терапия^[8]. Необходима е обаче консолидираща терапия >3 години преди да се спре NA[*]. Спирането на NA може да се окаже по-сложен въпрос, отколкото сме си представяли. Според някои проучвания HBV DNA се появява отново в повечето случаи, скоро след спирането на NA^[14]. Може да последват нови показания на ALT^[14], индикаторни за имунен отговор, а той да е ключът към имунен контрол с последваща загуба на HBsAg^[31]. При цироза обаче спиране на NA не се препоръчва.

ФАКТ

Хранопроводът е
дълъг горе-долу
25 см.



HBsAg в мониторирането на комбинирана терапия

Въпреки че комбинираната терапия не е препоръчителна, има нарастващ интерес при пациентите на дълготрайно лечение с NA да се започне PegIFN α с цел очистване от серума на HBsAg, т.е. functional cure. Ако се комбинират Tenofovir и PegIFN α и на 12^{ма} седмица нивото на HBsAg намалее с <1 log, това е стопиращо правило за PegIFN α според резултатите от глобално рандомизирано контролирано проучване^[20]. Предварителни данни от проучване в Китай показват, че HBeAg (+) пациенти, които са загубили HBeAg и имат ниско ниво на HBsAg level (<1 500 IU/ml) и са на терапия с NA, имат по-високи шансове да очистят от серума HBsAg след като преминат на PegIFN α ^[15]. Необходими са още данни, сред които влиянието на генотипа, за да се валидира това наблюдение.

Заклучение

В най-скоро време с внедряването на новите терапевтични стратегии, целящи клирънс на HBsAg, изследването на HBsAg ще се превърне в задължително изследване. Загубата на HBsAg е определена като най-важна крайна точка за ефикасност в клиничните проучвания фаза III на новите анти-HBV терапевтични средства и мониторирането на HBsAg ще бъде мерило за терапевтичен отговор. Според някои експерти са необходими по-чувствителни диагностични тестове за HBsAg, които да разграничават произхода на HBsAg от интегрираната HBV DNA

или от cccDNA. Невъзможността да се открие HBsAg в серума не винаги означава спиране на продукцията му, а може да се дължи на наличие на HBsAg escape мутанти^[37] или „маскиране“ на HBsAg в имунни комплекси с anti-HBs, което е доста често^[24]. Съвременните методи за количествена оценка на HBsAg не могат да разграничат трите подтипа HBs протеини (S, M, L-HBsAg).

Според съвременните консенсуси за лечение на СНВ трайната загуба на HBsAg по възможност с поява на anti-HBs е оптималната крайна терапевтична точка, позволяваща спиране на терапията^[30]. Пред прага на новите терапевтични стратегии трайната загуба на HBsAg или „Functional cure“ може да се разглежда и като първа успешна междинна стъпка по пътя към „Complete cure“ или елиминирани на вируса и всички негови репликативни продукти. ■

Библиография:

1. Bill CA, Summers J. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11135-11140.
2. Bock CT, Schranz P, Schröder CH, Zentgraf H. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* 1994;8:215-229.
3. Brunetto MR, Marcellin P, Cherubini B, Yurdaydin C, Farci P, Hadziyannis SJ, et al. Response to peginterferon alfa-2a (40K) in HBeAg-negative CHB: on treatment kinetics of HBsAg serum levels vary by HBV genotype. *J Hepatol* 2013;59:1153-1159.
4. Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F, Lau GK, Farci P, Yurdaydin C, 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;49:1141-1150.
5. Brunetto MR, Oliveri F, Cocco B, Leandro G, Colombaro P, Gorin JM, et al. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. *J Hepatol* 2002;36:263-270.
6. Brunetto MR, Oliveri F, Colombaro P, Moriconi F, Ciccorossi P, Cocco B, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 2010;139:483-490.
7. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 2007;13:65-73.
8. Chang ML, Liaw YF, Hadziyannis SJ. Systematic review: cessation of longterm nucleos(t)ide analogue therapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;42:243-257.
9. Cornberg M, Honer Zu Siederdisen C. HBsAg seroclearance with NUCs: rare but important. *Gut* 2014;63:1208-1209.
10. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012;57:167-185.
11. Gerlich WH. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology* 2013;10:239.
12. Gong SS, Jensen AD, Wang H, Rogler CE. Duck hepatitis B virus integrations in LMH chicken hepatoma cells: identification and characterization of new epismally derived integrations. *J Virol* 1995;69:8102-8108.

13. Gerlich W, Stamm B, Thomsen R [Prognostic significance of quantitative HBsAg determination in acute hepatitis B. Partial report of a cooperative clinical study of the DFG-focus of "virus hepatitis"]. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1977;83:554-557.
14. Hadziyannis SJ, Sevastianov V, Rapti I, Vassilopoulos D, Hadziyannis E. Sustained responses and loss of HBsAg in HBeAg-negative patients with chronic hepatitis B who stop long-term treatment with adefovir. *Gastroenterology* 2012;143:629-636 e1.
15. Han M, Jiang J, Hou J, Tan D, Sun Y, Zhao M, et al. Sustained immune control in HBeAg-positive patients who switched from entecavir therapy to pegylated interferon- α 2a: 1-year follow-up of the OSST study. *Antivir Ther* 2016.
16. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* 1984;52:396-402.
17. Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, Deterding K, Schlue J, Raupach R, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol* 2010;52:514-522.
18. Jaroszewicz J, Ho H, Markova A, Deterding K, Wursthorn K, Schulz S, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) decrease and serum interferon-inducible protein-10 levels as predictive markers for HBsAg loss during treatment with nucleoside/nucleotide analogues. *Antivir Ther* 2011;16:915-924.
19. Lau GK, Marcellin P, Brunetto M, Piravithu T, Kapprell HP, Messinger D, et al. On-treatment monitoring of HBsAg levels to predict response to peginterferon alfa-2a in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009;50:5333.
20. Lee JM, Ahn SH, Kim HS, Park H, Chang HY, Kim DY, et al. Quantitative hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers in prediction of treatment response to entecavir. *Hepatology* 2011;53:1486-1493.
21. Lee MH, Lee da M, Kim SS, Cheong JY, Cho SW. Correlation of serum hepatitis B surface antigen level with response to entecavir in naive patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2011;83:1178-1186.
22. Lenhoff RJ, Summers J. Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J Virol*; 1994;68:4565-4571.
23. Liu J, Yang H, Lee MH, Jen CL, Batrla-Ultermann R, Lu SN, et al. Serum levels of hepatitis B surface antigen and DNA can predict inactive carriers with low risk of disease progression. *Hepatology* 2016;64:381-389.
24. Madalinski K, Burczynska B, Heermann KH, Uy A, Gerlich WH. Analysis of viral proteins in circulating immune complexes from chronic carriers of hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol* 1991;84:493-500.
25. Manesis EK, Hadziyannis ES, Angelopoulou OP, Hadziyannis SJ. Prediction of treatment-related HBsAg loss in HBeAg-negative chronic hepatitis B: a clue from serum HBsAg levels. *Antivir Ther* 2007;12:73-82.
26. Marcellin P, Bonino F, Yurdaydin C, Hadziyannis S, Mouchari R, Kapprell HP, et al. Hepatitis B surface antigen levels: association with 5-year response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e-antigen-negative patients. *Hepato Int* 2013;7:88-97.
27. Marcellin P, Buti M, Krastev Z, de Man RA, Zeuzem S, Lou L, et al. Kinetics of hepatitis B surface antigen loss in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B treated with tenofovir disoproxil fumarate. *J Hepatol* 2014;61:1228-1237.
28. Markus Cornberg 1, Vincent Wai-Sun Wong 2, Stephen Locarnini 3, Maurizia Brunetto 4, Harry LA Janssen 5, Henry Lik-Yuen Chan 2. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. *Journal of Hepatology* 2017 vol. 66 j 398-411
29. Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, Raffa G, Alibrandi A, Cotronone G, et al. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. *Hepatology* 2012;56:434-443.
30. Revill P, Testoni B, Locarnini S, Zoulim F. Global strategies are required to cure and eliminate HBV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:239-248.
31. Rinker F, Honer Zu Siederdisen C, Bremer CM, Bremer B, Falk CS, Manns MP, et al. Induction of innate and adaptive immune responses after stopping NA therapy in HBeAg negative chronic hepatitis B. *Z Gastroenterol* 2015;53.
32. Seto WK, Hui AJ, Wong VW, Wong GL, Liu KS, Lai CL, et al. Treatment cessation of entecavir in Asian patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: a multicentre prospective study. *Gut* 2014;64:667-672.
33. Sonneveld MJ, Arends P, Boonstra A, Hansen BE, Janssen HL. Serum levels of interferon-gamma-inducible protein 10 and response to peginterferon therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2013;58:898-903.
34. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Cakaloglu Y, Simon K, Heathcote EJ, Tabak F, et al. Durable hepatitis B surface antigen decline in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients treated with pegylated interferon-alpha2b: relation to response and HBV genotype. *Antivir Ther* 2012;17:9-17.
35. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Zeuzem S, Heathcote EJ, Simon K, Senturk H, et al. Presence of precore and core promoter mutants limits the probability of response to peginterferon in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2012;56:67-75.
36. Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ito K, Acharya SK, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology* 2006;44:915-924.
37. Verheyen J, Neumann-Fraune M, Berg T, Kaiser R, Obermeier M. The detection of HBsAg mutants expressed in vitro using two different quantitative HBsAg assays. *J Clin Virol* 2012;54:279-281.
38. Wursthorn K, Lutgehelmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, et al. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006;44:675-684.
39. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 2012;1:e00049.
40. Zoulim F, Carosi G, Greenbloom S, Mazur W, Nguyen T, Jeffers L, et al. Quantification of HBsAg in nucleos(t)ide-naïve patients treated for chronic hepatitis B with entecavir with or without tenofovir in the BE-LOW study. *J Hepatol* 2015;62:56-63.
41. Zoutendijk R, Hansen BE, van Vuuren AJ, Boucher CA, Janssen HL. Serum HBsAg decline during long-term potent nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B and prediction of HBsAg loss. *J Infect Dis* 2011;204:415-418.