Correlation Between Serum and Tissue Viral Load, Serology, and Liver Damage in Patients with Hepatitis B

Hepatit B Hastalarında Serum Ve Doku Viral Yükü, Serolojisi Ve Karaciğer Hasarı Arasındaki İlişki

Hepatit B: Viral Yük, Seroloji, Biyopsi / Hepatitis B: Viral Load, Serology, Biopsy

Mesut Ortatatlı[1], Ramazan Gümral[2], Ahmet Özbek[3], Levent Kenar[1]
[1]GATA Tıbbi KBRN B.D. Başkanlığı, Ankara,
[2]GATA Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. Başkanlığı, Ankara,
[3]Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. Başkanlığı, Sakarya, Türkiye

Özet

Amaç: Çalışmamızda alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri normalden yüksek tedavi almamış kronik hepatit B (KHB) hastalarında serum ve doku HBV-DNA ile HBeAg/anti-HBe serokonversiyonu, ALT ve histolojik aktivite indeksi (HAİ) arasında bir ilişki olup olmadığı irdelenmiştir. Gereç ve Yöntem: Tedavi almamış KHB'li 31 hastaya karaciğer iğne biyopsisi yapıldı. Serum HBV-DNA ölçümü yapılırken, 19 hastanın biyopsi materyalinin histopatolojik incelemesinin ardından lamdan kazınarak, 12 hastanın ise direkt biyopsi materyalinden doku HBV-DNA ölçümleri gerçekleştirildi. Hastaların hepatit B serolojisi, Knodell HAİ ve ALT düzeyleri kayıt edildi. Bulgular: HBeAg pozitif hastaların serum HBV-DNA düzeyi negatif olanlara göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.01). HBeAg pozitif ve negatif hastaların serum ALT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark (p=0.02) saptanırken, karaciğer biyopsilerinde Knodell HAİ arasında önemli bir fark (p=0.44) saptanmadı. Serum ALT düzeyi ile Knodell HAİ arasında bir korelasyon görülmedi (p=0.18). Serum HBV-DNA miktarı ile ALT düzeyleri ve Knodell HAİ arasında anlamlı bir korelasyon (sırasıyla p=0.06 ve p=0.46) saptanmadı. Lam üzerinden alınan 19 doku örneğinden sadece dördünde HBV-DNA pozitifliği saptanırken, direkt biyopsi örneğinden bakılan 12 olgunun dokuzunda HBV-DNA pozitifliği belirlendi. Tartışma: ALT yüksek KHB hastalarında HBeAg pozitifliği varlığında, serum HBV-DNA düzeylerinin >105 kopya olduğu düşünülebilir. Bununla birlikte, HBeAg/anti-HBe serokonversiyonu gelişmiş olan hastalarda da serum HBV-DNA pozitifliği belirlenebilir. Karaciğerin HAİ ile serum HBV-DNA ve ALT düzeyleri arasında da bir korelasyon bulunmayabilir. KHB'li hastalarda serum HBV-DNA düzeyi, karaciğer histopatolojisi ve ALT düzeyleri birlikte incelendiği zaman, hastaların klinik seyirlerinin ve hastalığın aktivitesinin belirlenmesinde yol gösterici olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler

Hepatit B Virüs (HBV); HBV-DNA; HBeAg; Karaciğer İğne Biyopsisi

Abstract

Aim: In our study, correlation between serum alanine aminotransferase (ALT), histological activity index (HAI), HBeAg/antiHBe seroconversion and HBV-DNA levels in chronic hepatitisB (CHB) patients with higher ALT levels was investigated. Material and Method: Liver biopsy was performed on 31 untreated patients with CHB. Tissue HBV-DNA was measured from 19 samples from slides following histopathological examination and from the rest 12 from direct biopsy materials. Serum HBV-DNA was also measured for all patients. Hepatitis B serological pattern, Knodell HAI and ALT levels of the patients were analyzed and recorded. Results: Serum HBV-DNA levels of HBeAg(+) patients were found significantly higher than those in patients with HBeAg(-) (p<0.01). Although a significant difference was found in ALT levels of patients with HBeAg (+) and (-) (p=0.02), Knodell HAI data showed no correlation (p=0.44). No correlation was also observed between ALT and Knodell HAI (p=0.18). Serum HBV-DNA and ALT levels and Knodell HAI didn't indicate any significant correlation between each other (p=0.06 and p=0.46, respectively). Four slide samples and 9 biopsy materials had HBV-DNA(+). Discussion: In CHB patients with increased ALT and HBeAg(+), serum HBV DNA levels can be ≥105 copy/ml. Additionally, serum HBV-DNA(+) might be obtained in patients with seroconversion of HBeAg/antiHBe. Those patients might also had liver HAI which isn't correlated with HBV-DNA and ALT levels. So, we may conclude that serum HBV-DNA levels associated with histopathology and ALT may be used as a guide for clinical prognosis when it is evaluated with liver.

Keywords

Hepatitis B Virus (HBV); HBV-DNA; HBeAg; Liver Needle Biopsy

DOI: 10.4328/JCAM.1534 Received: 11.01.2013 Accepted: 01.02.2013 Printed: 01.11.2014 J Clin Anal Med 2014;5(6): 493-496
Corresponding Author: Mesut Ortatatlı, GATA Tıbbi KBRN Bilim Dalı Başkanlığı, 06018 Etlik, Ankara, Türkiye.
T.: +90 3123043305 GSM: +905332117572 E-Mail: mortatatli@gata.edu.tr

Giriş

Dünya genelinde yaklaşık iki milyar insan hepatit B virüsü (HBV) ile infekte olmuş ve 350 milyonu kronik HBV infeksiyonu ile hayatına devam etmektedir. Hastalığın seyri asemptomatik taşıyıcılıktan siroz ve hepatoselüler karsinomaya kadar değişiklik göstermekte olup, yılda 600 000 insanın ölümüne neden olmaktadır [1]. Türkiye, %3.9 – 12.5 arasındaki HBsAg seroprevalansı değerleri ile orta derecede endemik bir ülke konumundadır [2]. Kronik HBV infeksiyonu, hepatit B e antijen (HBeAg) durumu, serum alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi ve HBV-DNA seviyesine göre çeşitli klinik tablolarla ifade edilebilmektedir [3,4]. Vireminin yüksek olduğu hastaların serumlarında HBeAg'nin yüksek oranda saptanması nedeniyle bu antijen uzun süre viral replikasyonun güvenilir bir göstergesi olarak kullanılmıştır. Viral DNA'yı saptayan testlerin geliştirilmesiyle mutant virüsle infekte, HBV-DNA (+) ve HBeAg (-) olguların gösterilmesi, HBeAg'nin viral replikasyon göstergesi olma değerini azaltmıştır. Ayrıca hasta serumunda virüs partiküllerinin kantitatif olarak belirlenebilmesini sağladığı için infeksiyonunun prognozunu belirlemede ve tedavinin etkinliğini izlemede de yararlıdır [5].

Teorik olarak artmış serum ALT düzeyi karaciğer hasarını yansıtmakla birlikte, literatürde HBeAg negatif, ALT seviyesi normal olan hastalarda yüksek HBV-DNA düzeyi ve belirgin karaciğer hasarı olguları rapor edilmiştir [6,7].

Çalışmamızda serum ALT düzeyleri normalden yüksek tedavi almamış kronik hepatit B (KHB) hastalarında serum ve doku HBV-DNA'sı ile HBeAg/anti-HBe serokonversiyonu, ALT ve Knodell histolojik aktivite indeksi (HAİ) arasında bir ilişki olup olmadığı irdelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Tedavi almamış serum ALT düzeyleri normalden yüksek (normal değer aralığı 10-35 U/L) kronik hepatit B'li 20-32 (21.93±2.46) yaşlarında 31 erkek hastaya aydınlatılmış onam formu alınıp karaciğer iğne biyopsisi yapıldı. Karaciğer biyopsi örnekleri önce Knodell HAİ için lam üzerine alındı ve mikroskobik düzeyde histopatolojik olarak değerlendirildi. Ardından 19 hastanın hazırlanmış lamları ksilol ile muamele edilerek hem üzerlerindeki lamel kolaylıkla kaldırıldı hem de lam üzerine sabitlenmiş olan dokunun lamdan ayrılması sağlandı. Lam üzerinden alınan dokular ve diğer 12 hastadan alınan karaciğer iğne biyopsi materyalinden 1 cm.'lik parça 2 ml.'lik eppendorf tüplerine aktarıldı. DNA eldesi için "QIAamp® DNA mini-kit (QIAGEN®, GMBH, Germany)" kitinin "Doku Protokolü" kullanıldı ve üretici firma tarafından tavsiye edilen işlem basamaklarına bağlı kalınarak uygulandı.

Hasta kan örnekleri kontaminasyondan uzak yöntemlerle, antikoagülan içermeyen steril vacutainer tüplerinde toplandı. Tüpler santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı ve DNA eldesi için kullanıldı. Bu işlem için "QIAamp® MiniElute Virus Spin Kit (QIAGEN®, GMBH, Germany)" kullanıldı. Üretici firma tarafından tavsiye edilen işlem basamaklarına uyularak DNA eldesi yapıldı.

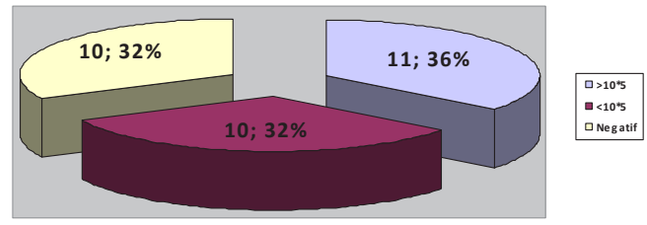
Örneklerden toplanan DNA'lar PCR amplifikasyonuna kadar -20oC'da saklandı. Hastaların hepatit B serolojisi ve ALT düzeyleri kayıt edildi.

PCR Amplifikasyonu: HBV QNP 2,0 Real-Time PCR Kiti (Fluorion®, Iontek, Istanbul, Turkey) kullanılarak HBV DNA amplifikasyonu yapıldı. PCR reaksiyonu için iCycler IQ Multicolor Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD® Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) cihazı kullanıldı. Test sonuçları "BBL®-HBV-DNA Quantitative Stantards" kullanılarak kantitatif olarak saptandı.

İstatistiksel analizlerde veriler, SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL., USA) paket programında değerlendirildi. Serum HBV-DNA, doku HBV-DNA ve ALT verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım göstermemesi üzerine parametrik olmayan istatistik analizler kullanıldı. İki bağımsız değişken arasındaki (HBeAg negatif ve pozitifliği ile serum ALT düzeyi) ilişki Mann-Whitney U, üç bağımsız değişken arasındaki (HBV-DNA miktarı >105, <105 ve negatif olan hastaların da ALT düzeyleri) ilişki Kruskal-Wallis test ile araştırıldı. Serum HBV-DNA ile Doku HBV-DNA ve karaciğerin HAİ ile serum HBV-DNA ve ALT düzeyleri arasındaki korelasyon analizleri Spearman korelasyon testi ile yapıldı. p≤0.05 değerleri için "aradaki farklılığın istatistiksel açıdan önemli olduğu", p>0.05 değerleri için "aradaki farklılığın istatistiksel açıdan önemli olmadığı" yorumları yapıldı.

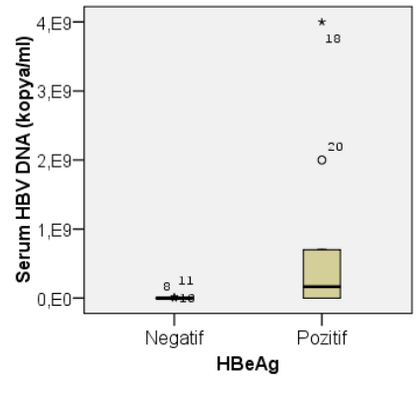
Bulgular

Çalışmaya alınan 31 kronik hepatit B'li hastanın 21'nin HBeAg'si negatif, 10'unun pozitifti. Serum HBV-DNA ölçümlerine göre yapılan gruplama da ise hastaların 21'inde serum HBV-DNA pozitifliği saptandı (Şekil 1). Bunların 11'inde HBV-DNA miktarı >105 kopya/ml bulundu ve dokuzunda HBeAg pozitifliği mevcuttu. Serum HBV-DNA miktarı 105 kopya/ml'den az olan on hastada ise HBeAg negatif, anti-HBe pozitif belirlendi. Serum HBV-DNA'sı negatif olan 10 hastanın ise sadece birinde HBeAg pozitifliği saptandı.



Şekil 1. Hastaların serum HBV-DNA düzeylerine göre gruplandırılması (hasta sayısı; yüzde oranı).

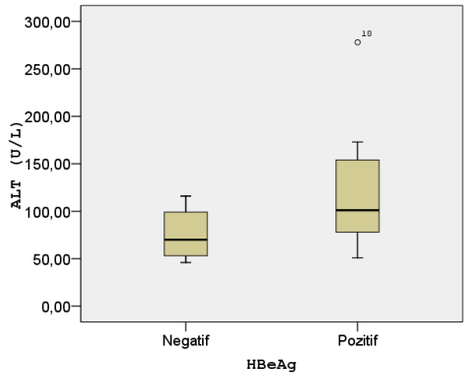
HBeAg pozitif hasta grubunun serum HBV-DNA düzeyi negatif olanlara göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.01) (Şekil 2). Serum HBV-DNA miktarının >105, <105 ve negatif olması ile HBeAg pozitifliği arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir



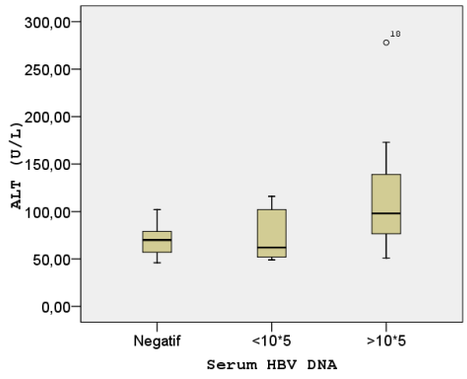
Şekil 2. HBeAg pozitif ve negatif hastaların serum HBV-DNA düzeyleri (p<0.01).

fark (p<0.01) belirlendi. Bu fark HBV-DNA miktarı >105 olanlar ile <105 ve negatif ölçülen gruplar arasında gözlendi (her ikisi için p<0.01).

HBeAg pozitif ve negatif olan hastaların serum ALT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark (p=0.02) saptanırken (Şekil 3), karaciğer biyopsilerinde Knodell HAİ arasında önemli bir fark (p=0.44) saptanmadı. Serum ALT düzeyi ile Knodell HAİ arasında bir korelasyon görülmedi (p=0.18). Serum HBV-DNA miktarı ile ALT düzeyleri ve Knodell HAİ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon (sırasıyla p=0.06 ve p=0.46) saptanmadı. Serum HBV-DNA miktarı >105, <105 ve negatif olarak üç gruba ayırdığımız hasta gruplarının ALT düzeyleri arasında da anlamlı bir fark (p=0,14) görülmedi (Şekil 4). Lam üzerinden alınan 19 doku örneğinden sadece dördünde HBV-DNA pozitifliği saptanırken, direkt biyopsi örneğinden bakılan 12 olgunun dokuzunda HBV-DNA pozitifliği belirlendi.



Şekil 3. HBeAg pozitif ve negatif hastaların serum ALT düzeyleri (p=0.02).



Şekil 4. Serum HBV-DNA miktarı >105, <105 ve negatif ölçülen hasta gruplarının ALT düzeyleri (p=0,14).

Tartışma

Ülkemizde ve dünya genelinde önemli bir sağlık problemine neden olan HBV infeksiyonlarının doğal seyri, konak immün yanıtı ile virüs replikasyonu arasında gerçekleşen kompleks olaylar neticesinde üç fazda incelenebilir. İmmüntolerans, immün (clearance) temizleme ve inaktif fazlar sonrasında kronik HBV infeksiyonları klinik, serolojik ve virolojik olarak klasik kronik HBV (HBeAg pozitif), atipik kronik HBV (HBeAg negatif) ve inaktif taşıyıcı kronik HBV olmak üzere üç paterne ayrılır [8]. Çalışmaya alınan ALT düzeyi normalden yüksek 31 hastanın 21'i atipik, 10'u ise klasik kronik hepatit B hastasıydı. Serum HBV-DNA pozitifliği saptanana 21 olgunun 11'inde HBV-DNA miktarı >105 kopya/ml bulundu ve bunların dokuzunda HBeAg pozitifliği mevcuttu. Serum HBV-DNA miktarı 105 kopya/ml'den az olan on hastada ise HBeAg negatif, anti-HBe pozitif belirlendi. Serum HBV-DNA'sı negatif olan 10 hastanın ise sadece birinde HBeAg pozitifliği saptandı.

Literatürde HBeAg pozitif ve negatif hastaların serum HBV-DNA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [9–11]. Çalışmamızda HBeAg pozitif hasta grubunun serum HBV-DNA düzeyi negatif olanlara göre anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.01). Hastalarda HBeAg'nin pozitif ve negatif olması ile ölçülen serum HBV-DNA miktarının >105, <105 ve negatif olması arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark (p<0.01) belirlendi. Bu fark HBV-DNA miktarı >105 olan grup ile <105 ve negatif ölçülen gruplar arasında gözlendi (her ikisi için p<0.01). HBeAg pozitif hastaların negatiflere oranla daha yüksek HBV replikasyon düzeyine sahip oldukları rapor edilmiştir [12,13]. Literatür bilgileri ile birlikte değerlendirildiğinde, serum ALT'si yüksek KHB hastalarında HBeAg pozitifliği varlığında, serum HBV-DNA düzeylerinin >105 kopya olduğu düşünülebilir. Bununla birlikte, HBeAg/anti-HBe serokonversiyonu gelişmiş olan hastalarda da serum HBV-DNA pozitifliği belirlenebilmektedir [5,6].

Özkara ve ark. [14] serum ALT düzeyi ile HAİ arasında pozitif bir korelasyon gözlemlediklerini, Yalçın ve ark. [9] özellikle HBeAg negatif olgularda daha ciddi karaciğer hasarı olduğunu ifade etmişlerdir. Güner ve ark. [15] ile Seto ve ark. [16] ise serum ALT düzeyi ile HAİ arasında bir korelasyon tespit etmemişlerdir. Literatürde genelde HBeAg pozitif/negatif hastaların ALT düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulmayan [9–11] çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda ise HBeAg pozitif hastaların serum ALT düzeyleri negatif olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde yüksek (p=0.02) saptanırken (Şekil 3), Knodell HAİ arasında önemli bir fark (p=0.44) saptanmadı. Serum ALT düzeyi ile Knodell HAİ arasında da bir korelasyon görülmedi (p=0.18).

Kronik HBV'nin immüntoleran fazında yüksek serum HBV-DNA'ya rağmen karaciğer biyopsisinde düşük nekroinflamatuar aktivite görülebilmektedir [17]. Yalçın ve ark. [9] ile Xie ve ark. [10] çalışmalarında HBV-DNA miktarı ve ALT düzeyi arasında bir korelasyon saptamadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, serum HBV-DNA miktarı ile ALT düzeyleri ve Knodell HAİ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon (sırasıyla p=0.06 ve p=0.46) saptanmadı. Serum HBV-DNA miktarı >105, <105 ve negatif olarak üç gruba ayırdığımız hasta gruplarının ALT düzeyleri arasında da anlamlı bir fark (p=0,14) görülmedi (Şekil 4). Lin ve ark. HBeAg negatif hasta grubunda yaptıkları çalışmalarında serum HBV-DNA ile cccDNA ve total intrahepatik HBV-DNA arasında bir korelasyon saptadıklarını bildirmişlerdir [18]. Benzer bir çalışmada Güner ve ark. da serum HBV-DNA ile intrahepatik HBV-cccDNA arasında korelasyon belirlemişlerdir [15]. Benzer şekilde çalışmamızda da, karaciğer iğne biyopsisi materyalinden direkt alınan 12 doku parçasının dokuzunda HBV-DNA pozitifliği saptandı. Ancak, bu örneklerin doku ve serum HBV-DNA'ları arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı (p=0.22). Lamdan alınan 19 doku örneğinden yapılan HBV-DNA ölçümlerinin ise sadece dördünde pozitiflik bulunması; lamdan kazınarak elde edilen örneklerden yapılmasına ve dolayısıyla yeterli doku ve DNA ekstraksiyonun sağlanamamış olmasına bağlandı. Viral replikasyonun belirlenmesinde karaciğer dokusundan direkt ola-

rak HBV DNA ölçümleri yapılmasını amaçlayan daha ileri çalışmalara gereksinim olduğu ortaya çıkmaktadır.

Karaciğerin Knodell HAİ ile HBeAg serokonversiyonu, serum HBV-DNA ve ALT düzeyleri arasında bir korelasyon bulunmayabilir [9–11,16]. KHB'li hastalarda serum HBV-DNA düzeyi, karaciğer histopatolojisi ve ALT düzeyleri birlikte incelendiği zaman, hastaların klinik seyirlerinin ve hastalığın aktivitesinin, tedavi endikasyonu ve şeklinin belirlenmesinde yol gösterici olabilmektedir.

Çıkar Çakışması ve Finansman Beyanı

Bu çalışmada çıkar çakışması ve finansman destek alındığı beyan edilmemiştir.

Kaynaklar

1. Gandhi SJ. Hepatitis B outbreak investigation report in Sabarkantha District, Gujarat State, February 2009. Int J Med Med Sci 2011;3(2):109–21.
2. Taşyaran MA. HBV infeksiyonu epidemiyolojisi. In: Tekeli E, Balık İ, editors. Viral Hepatit 2003. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği; 2003.p.121–8.
3. Papatheodoridis GV, Manolakopoulos S, Liaw Y-F, Lok A. Follow-up and indications for liver biopsy in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection with persistently normal ALT: a systematic review. J Hepatol 2012;57(1):196–202.
4. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. J Hepatol 2008;48(2):335–52.
5. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. J Infect Dis 1999;179(4):775–82.
6. Lin C-L, Liao L-Y, Liu C-J, Yu M-W, Chen P-J, Lai M-Y, et al. Hepatitis B viral factors in HBeAg-negative carriers with persistently normal serum alanine aminotransferase levels. Hepatology 2007;45(5):1193–8.
7. Kumar M, Sarin SK, Hissar S, Pande C, Sakhuja P, Sharma BC, et al. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus-infected asymptomatic patients with persistently normal ALT. Gastroenterology 2008;134(5):1376–84.
8. Yamazhan T. Kronik Viral Hepatit B. In: Ulusoy S, Leblebicioglu H, editors. Viral İnfeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp; 2011. p.51–66.
9. Yalcin K, Degertekin H, Yildiz F, Celik Y. Markers of disease activity in chronic hepatitis B virus infection. Clin Invest Med 2003;26(1):27–34.
10. Xie Y, Zhao H, Dai W-S, Xu D-Z. HBV DNA level and antigen concentration in evaluating liver damage of patients with chronic hepatitis B. HBPD INT 2003;2(3):418–22.
11. Kaya S, Yönem Ö, Özdemir L, Sümer Z. Hepatit B Virüsü (HBV) Dna Miktarları ile Serum Alanin Aminotransferaz Düzeyleri ve HBV Serolojik Göstergeleri Arasındaki İlişki. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2006;13(1):21–4.
12. Bayram A, Erkilic S, Ozkur A, Bayram M, Sari I. Quantification of intrahepatic total hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients and its relationship with liver histology. J Clin Pathol 2008;61(3):338–42.
13. Wong DK-H, Yuen M-F, Yuan H, Sum SS-M, Hui C-K, Hall J, et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. Hepatology 2004;40(3):727–37.
14. Özkara S, Tosun İ, Sari B, Kiliç G, Vardar Aker F, Sezikli M, et al. The Correlation of Serum Transaminase Values with Fibrosis Staging and Necroinflammatory Activity Scores in Chronic Hepatitis. Turkiye Klinikleri J Med Sciences 2011;31(1):68–74.
15. Guner R, Karahocagil M, Buyukberber M, Kandemir O, Ural O, Usluer G, et al. Correlation between intrahepatic hepatitis B virus cccDNA levels and other activity markers in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B infection. Eur J Gastroenterol Hepatol 2011;23(12):1185–91.
16. Seto W-K, Lai C-L, Ip PPC, Fung J, Wong DK-H, Yuen JC-H, et al. A large population histology study showing the lack of association between ALT elevation and significant fibrosis in chronic hepatitis B. PLoS ONE 2012;7:e32622.
17. Andreani T, Serfaty L, Mohand D, Dernaika S, Wendum D, Chazouillères O, et al. Chronic hepatitis B virus carriers in the immunotolerant phase of infection: histologic findings and outcome. Clin Gastroenterol. Hepatol 2007;5(5):636–41.
18. Lin LY, Wong VWS, Zhou HJ, Chan HY, Gui HL, Guo SM, et al. Relationship between serum hepatitis B virus DNA and surface antigen with covalently closed circular DNA in HBeAg-negative patients. J Med Virol 2010;82(9):1494–500.