

Literatür özeti

Hepatit B virusunun genel özellikleri

Hepatit B virusu (HBV), akut ve kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma yol açan küresel bir halk sağlığı sorunudur (1). *Hepadnaviridae* ailesinin bir üyesi olan HBV, zarflı bir virustur. Kor proteinlerinden oluşan kapsidin içinde DNA yapısında viral genom ve viral polimeraz enzimi yer almaktadır. Yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğundaki viral DNA, çembersel yapıda ve kısmen çift ipliklidir (1; 2). Tam uzunluktaki DNA iplikçığı 3020 - 3320, diğer iplikçik ise 1700 - 2800 baz çifti uzunluğundadır (3). Viral genom birbiri ile örtüşen dört açık okuyan çerçeveye sahiptir.

HBV karmaşık bir replikasyon döngüsüne sahiptir. Replikasyonunda ters transkriptaz enzimini kullanan bilinen az sayıdaki non-retroviral viruslardan biridir (4; 5) DNA virusu olmasına rağmen HBV genomu önemli ölçüde varyasyon göstermektedir. Akut enfeksiyon sırasında virionlara günde 10^{10} hatalı sentezlenmiş nükleotid girdiği bildirilmektedir (6). HBV genomu için hesaplanan mutasyon hızının $1.4 - 3.2 \times 10^{-5}$ substitüsyon/nokta/yıl düzeyinde olduğu, bu hızın yüzey antijeni için daha da yüksek olduğu bildirilmektedir (7).

HBV zarf proteinleri

Hepatit B virusu zarf proteinleri E açık okuyan çerçevesinde kodlanmaktadır. İnsan HBV genomunda üç farklı transkripsiyon başlangıç noktası bulunmaktadır. Pre-S1, Pre-S2 ve S transkripsiyon başlangıç noktalarının kullanılmasına göre sırası ile 400, 281 ve 226 amino asit uzunluğunda zarf proteinleri üretilmektedir. Bu proteinler sırası ile L, M ve S zarf glikoproteinleri olarak adlandırılmaktadır (5; 8; 9).

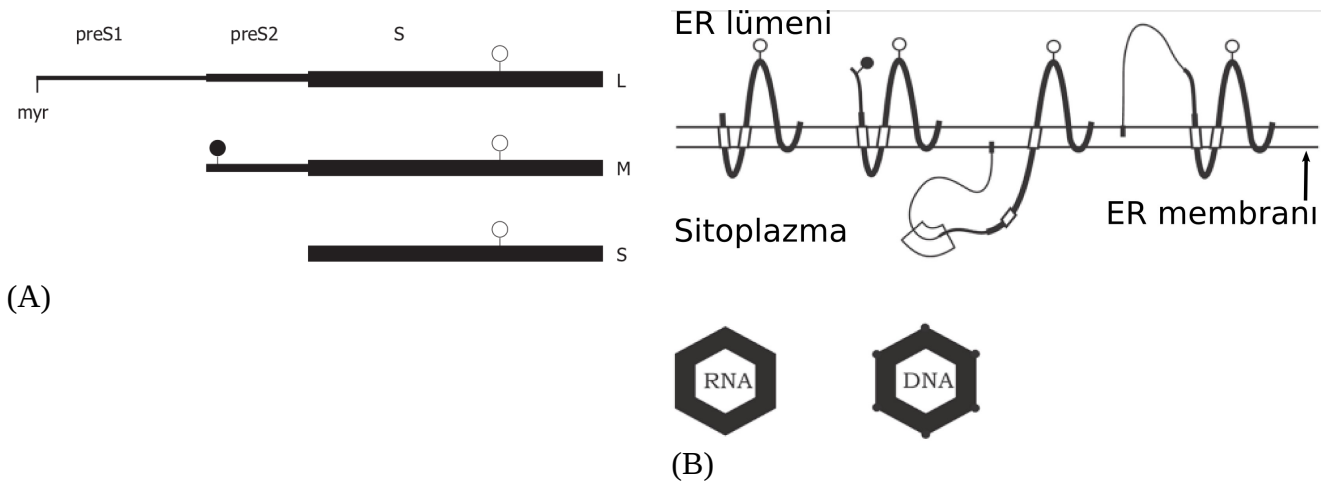
HbsAg'nin üç boyutlu yapısını incelemek mümkün olmamıştır. Nativ HbsAg izole edilemediği için proteinin tersiyer yapısı ile ilgili bilgilerimiz daha çok diziyi oluşturan amino asitlerin fizikokimyasal özelliklerini kullanarak gerçekleştirdiğimiz hesaplamalara ve mutagenез çalışmalarına dayanmaktadır (9–13). Buna göre HbsAg (hepatit B virusu glikoprotein 2: HBVgp2), dört transmembran heliksin oluşturduğu çerçeve yapının desteklediği viral zarf yüzeyinde yükselen majör hidrofilik bölgeden (ilmek) oluşmaktadır (4; 9; 13)

HBV zarf proteinleri de diğer proteinler gibi endoplazmik retikulumda sentezlenmektedir. S peptidinin 8 ile 22'nci amino asitleri endoplazmik retikulum (ER) zarına insersiyon için gerekli sinyal motifini içerdiği bildirilmektedir. Peptidin 80 ile 98'inci amino asitleri arasında bulunan ikinci bir sinyal bölgesi

ise S proteininin C-terminalinin ER lümenine doğru oryante olmasını sağladığı düşünülmektedir. Peptidin son 57 amino asiti ise endoplazmik retikulum membranına yerleştiği düşünülen hidrofobik aminoasitlerden oluşmaktadır. ER lümeninde yer alan protein ilmeğinde bir adet N-glikozilasyon bölgesi bulunduğu öngörülmektedir (4; 14).

S peptidinden 165 nükleotid geride transkripsiyon başlangıç noktasına sahip M proteini, 281 amino asitten oluşmaktadır. N-terminalde yer alan ekstra amino asitler, sentez sonrasında endoplazmik retikulum lümenine doğru oryante olduğu bildirilmektedir. Bu bölgede, S peptidindekine ek olarak bir adet daha N-glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır (4; 14).

L peptidi 1203 nükleotid tarafından kodlanmakta ve 400 amino asitten oluşmaktadır. Transkripsiyon başlangıç noktası, M proteinininkinden 357 nükleotid geride yer almaktadır. L peptidinin N-terminalinde yer alan ikinci amino asit glisin, miristoyile olarak endoplazmik retikulum membranına girmektedir. Sentezden sonraki ilk katlanmada, proteinin miristoyile olarak membrana tutunan N-terminali ile S-peptidi ikinci ER insersiyon sinyal bölgesi arasında kalan protein ilmeğinin sitoplazma tarafında yerleştiği düşünülmektedir. L peptidinin bu konfigürasyonu i-preS olarak adlandırılmaktadır. S peptidi birinci sinyal bölgesinin ER membranına insersiyonu ile L peptidi yeniden katlanma geçirmekte, miristoyile olmuş uç ile S birinci sinyal bölgesi arasında kalan protein ilmeği, ER lümenine doğru oryante olarak e-preS konfigürasyonuna gelmektedir. Bu konformasyonlardan i-preS, kapsid proteinleri ile etkileşime girerken, e-preS'in viral zarfın dışında yer alarak enfekte edilecek hücrelere girişte rol oynadığı düşünülmektedir. L peptidi N-terminal kısmında öncekilere ek olarak bir adet daha potansiyen N-glikozilasyon noktası bulunmaktadır (10; 13; 14).



Şekil 1. L, M ve S peptidlerin lineer haritaları (A) myr: L peptidi miristoyilasyon bölgesi, açık ve kapalı yuvarlaklar: N-glikozilasyon noktaları. Peptidlerin sentez sonrası ER membranında katlanmaları (B) (4).

S peptidinin ER lümeninde bulunan ilmeğinde sistein amino asitleri disülfid köprüleri yapmaktadır (15).

S peptidi üzerinde bulunan a – determinantı, HBV enfeksiyonu tanısında kullanılan antikor tabanlı testlerde kullanılan bölge olmasının yanı sıra, HBV aşılı için de en önemli hedefi oluşturmaktadır (16–21).

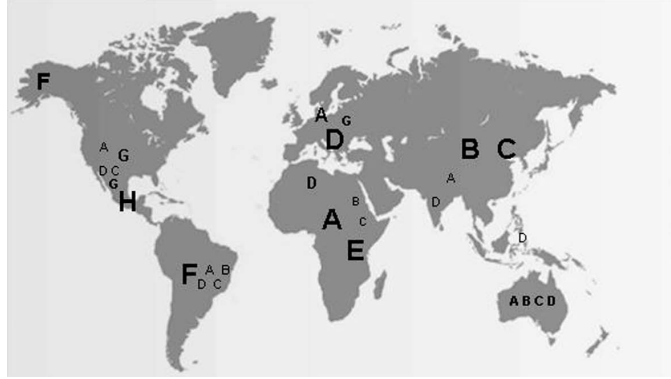
HBV enfeksiyonunun tanısında yararlanılan iki önemli test, serumda HBsAg'nin ve anti-HBsAg antikorlarının saptanmasıdır (22; 23). Gelişmekte olan ülkelerde kronik HBV enfeksiyonu prevalansının %8 düzeyinde bulunması ve bu bireylerin %80'inin hiçbir belirti göstermeksizin virüsü taşıyor olmaları, duyarlı test sistemlerinin kullanılması önemini göstermektedir (24). Testlerin duyarlılığı, enfeksiyonu saptanmasını güçleştiren pencere aralığının da daralmasını sağlayarak tanılal süreci hızlandırmaktadır. RNA aracılı bir replikasyon döngüsüne sahip olan HBV'nun genomunda ve özellikle yüzey antijeni HBVgp2 geninde oluşan mutasyonlar, HBsAg'nine yönelik duyarlı tanılal testlerin geliştirilmesinde önemli zorlukları da beraberinde getirmektedir (9). HBV suşları, S peptidinin zarftan dışarı doğru çıkan ve hepatositlerdeki reseptöre bağlanmada rol oynayan majör hidrofilik bölgesinde yer alan a – determinantı dizisine göre genotiplendirilmektedir (25). S peptidi 122, 127 ve 160 numaralı amino asitlerine göre belirlenen a - determinantı genotiplerinin HBV genotiplerine dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Tablo 2'de ise, a - determinantı genotiplerini oluşturan amino asit kombinasyonları sıralanmıştır (25–28).

Tablo 1. HBV genotipleri ile a – determinantı genotipleri (17; 18; 25; 27; 28).

HBV Genotipi	a – determinantı genotipleri
A	adw2 (nadiren ayw1)
B	adw2, ayw1
C	adw2, ayr, adrq-
D	ayw2, ayw3, ayw4
E	ayw4 (nadiren adw2)
F	adw4q-
G	adw2
H	adw4

Tablo 2. a – determinantı genotipleri (25–28)

S peptidi amino asit pozisyonu ve amino asit	HBVgp2 geni S fragmentindeki nükleotid pozisyonu ve nükleotid	Genotip
122: Lys	365: A	d
122: Arg	365: G	y
127:		w1
127:		w2
127:		w3
127:		w4
160: Lys	479: A	w
160: Arg	479: G	r



Şekil 2. HBV genotiplerinin coğrafi dağılımı (25).

HBV genotipleri ile kronikleşme ve hepatoselüler kanser gelişimi arasında ilişki olduğuna ilişkin veriler bulunmaktadır (18; 29–31). A – H genotipleri ile birlikte bulunması olası HBVgp2 (HBsAg) a – determinantı genotipleri Tablo 2’de sıralanmıştır. Ancak, serolojik yönden öneme sahip majör hidrofilik bölge mutasyonları bunlar ile sınırlı değildir. Majör hidrofilik bölgenin 107 – 138 ve 139 – 147 amino asit pozisyonları ile belirlenen ilmeklerinde yer alan bir çok mutasyon rapor edilmiştir (17; 18; 26; 30–36). HBV’nun halk sağlığı yönünden önemi düşünüldüğünde, bu mutasyonların tanınal kitlerin duyarlılıkları üzerindeki etkileri ve bu kitlerde yapılması gereken revizyonlar süreklilik gösteren bir araştırma ve geliştirme alanını oluşturmaktadır (37–40). HBV genotiplerinin ve bununla paralellik gösteren HBsAg serotipleri coğrafi dağılım gösteriyor olsa da, ulaşım olanaklarının ve ticari

ilişkilerin çok arttığı küreselleşmiş modern dünyada, tanısal kitlerin dağılımdan bağımsız olarak duyarlılık ve özgüllük göstermesi gerekliliği bulunmaktadır (25). Türkiye'de yapılan çalışmalarda, diğer genotipler ile ilgili vaka raporları bulunmakla birlikte, D genotipinin baskın tip olduğu bildirilmektedir (33; 34). Leblebicioğlu ve ark., Hepatit Çalışma Grubu'nun verilerini sundukları çalışmalarında test ettikleri 147 HBV pozitif hastanın 129'unun D genotipinde, bunların da 122'sinin D2 alt tipinde olduğunu bildirmiştir (33).

Yuan ve ark. HBsAg PreS1 ve kor antijenlerini kombine olarak test etmek üzere geliştirdikleri ELISA testinin duyarlılığının HBV DNA saptanması ile aynı olduğunu, ancak test edilen 271 hastadan birinin a – determinantında bulunan bir mutasyon nedeni ile negatif sonuç verdiğini bildirmektedir (41). Yedi ticari HBsAg saptamaya yönelik ELISA kitini değerlendiren Deguchi ve ark., HBsAg genotiplerinin kitlerin saptama alt sınırlarını etkileyebildiğini ve bazı kitlerin belirli genotipleri tanıyamayarak yalancı negatif sonuç verdiğini göstermiştir (42). Otomatize sistemlerin kullanıldığı IMMULITE HBsAg, IMMULITE HBsAg 2000, Elecsys HBsAg, Auszyme Monoclonal, IMx HBsAg, AxSYM HBsAg ve PRISM HBsAg testlerini karşılaştıran Weber ve ark., sistemler arasındaki duyarlılık farklarının mutantlara karşı duyarlılık farklarından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (43; 44). Ali ve ark., dokuz majör HBsAg a – determinantı tipinden başka, çoğu majör hidrofilik ilmek üzerinde oluşmuş mutantların otomatize HBsAg testlerinin duyarlılıklarını etkilediğini göstermişlerdir (45). Onyedici CE belgeli HBsAg saptama kitini karşılaştıran Scheiblaue ve ark., test edilen HBV'nun serotipine bağlı olarak test sistemlerinin saptama alt sınırlarının 5 – 10 kat farklı olduğunu saptamışlardır (46; 47).

Bu proje kapsamında, HBsAg ELISA ve anti-HBsAg ELISA testlerinin geliştirilmesinde kullanılacak rekombinant HBVgp2 proteinin sentezi gerçekleştirilecektir. Bu amaçla, bakteriyel ve maya ekspresyon sistemleri kullanılacaktır. Ekspresyon vektörlerine klonlanacak referans HBVgp2 mutant dizilerinin elde edilmesi için, genomuna entegre durumda HBV genomu taşıyan hepatoselüler karsinom hücre hatlarından elde edilen transkriptlerden yararlanılacaktır. Bu transkriptlerden elde edilecek genetik materyale yönlendirilmiş mutagenез yöntemleri kullanılarak istenilen genotip kazandırılacaktır. Proteinlerin nativ ve immünoreaktif şekilde eksprese edilmesi ve saflaştırılması için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilecektir.

Kaynaklar:

1. Tan J, Lok AS. Update on viral hepatitis: 2006. Curr. Opin. Gastroenterol. 2007 May;23(3):263-267.[cited 2011 Sep 2]

2. Rodríguez-Frias F, Jardi R. [Molecular virology of the hepatitis B virus]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2008 May;26 Suppl 7:2-10.[cited 2011 Sep 2]
3. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Research* 2007 Aug;127(2):164-176.[cited 2011 Sep 2]
4. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2007 Jan;13(1):65-73.[cited 2011 Sep 3]
5. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.* 2007 Jan;13(1):48-64. [cited 2011 Sep 3]
6. Doo E, Liang TJ. Molecular anatomy and pathophysiologic implications of drug resistance in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2001 Mar;120(4):1000-1008.[cited 2011 Sep 2]
7. Zaaijer HL, Bouter S, Boot HJ. Substitution rate of the hepatitis B virus surface gene. *J. Viral Hepat.* 2008 Apr;15(4):239-245.[cited 2011 Sep 4]
8. Samuel Baron AJZ. Hepatitis Viruses [Internet]. 1996;[cited 2011 Sep 2] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7864/>
9. Ie SI, Thedja MD, Roni M, Muljono DH. Prediction of conformational changes by single mutation in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) identified in HBsAg-negative blood donors. *Virol J* [date unknown];7:326-326.
10. Urban S, Gripon P. Inhibition of Duck Hepatitis B Virus Infection by a Myristoylated Pre-S Peptide of the Large Viral Surface Protein. *J. Virol.* 2002 Feb;76(4):1986-1990.[cited 2011 Sep 4]
11. Engelke M, Mills K, Seitz S, Simon P, Gripon P, Schnölzer M, Urban S. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* 2006 Apr;43(4):750-760. [cited 2011 Sep 4]
12. Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 2007 Dec;46(6):1759-1768. [cited 2011 Sep 4]
13. Peterson DL, Nath N, Gavilanes F. Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety. *J. Biol. Chem.* 1982 Sep;257(17):10414-10420.[cited 2011 Sep 4]
14. Eble BE, MacRae DR, Lingappa VR, Ganem D. Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol. Cell. Biol.* 1987 Oct;7(10):3591-3601.[cited 2011 Sep 4]
15. Xiong S, Wang Y-F, Ren X-R, Li B, Zhang M-Y, Luo Y, Zhang L, Xie Q-L, Su K-Y. Solubility of disulfide-bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its “oxidizing” mutant. *World J. Gastroenterol.* 2005 Feb;11(7):1077-1082.[cited 2011 Sep 2]
16. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K, Dornan E, McIntyre G, Waters J, Kliem V, Müller R, Thomas HC, Manns MP. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996 Sep;24(3):489-493.[cited

2011 Sep 4]

17. Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, Kumarasamy T, Thyagarajan SP. Transmission of “a” determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. *Jpn. J. Infect. Dis* 2008 Jan;61(1):73-76.[cited 2011 Aug 17]
18. Ruiz-Tachiquín M-E, Valdez-Salazar H-A, Juárez-Barreto V, Dehesa-Violante M, Torres J, Muñoz-Hernández O, Alvarez-Muñoz M-T. Molecular analysis of hepatitis B virus “a” determinant in asymptomatic and symptomatic Mexican carriers. *Virol J* [date unknown];4:6-6.
19. Bo H, Minjian L, Guoqiang H, Zhaoxia L, Zhenyu Z, Lin L. Expression of hepatitis B virus S gene in *Pichia pastoris* and application of the product for detection of anti-HBs antibody. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005 Nov;38(6):683-689.[cited 2011 Sep 2]
20. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 1984 Jan;307(5947):178-180.[cited 2011 Sep 4]
21. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. 1984. *Biotechnology* 1992;24:500-502.[cited 2011 Sep 4]
22. Odinsen O, Owusu-Ofori S, Dompreeh A, Sarkodie F, Opare-Sem O, Parker D, Allain J-P. Antibody Detection and Kinetics of Antibody Production during Early Stages of Immunization with Hepatitis B Virus Vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007 Dec;14(12):1623-1628.[cited 2011 Sep 2]
23. Cambron P, Jacquet J-M, Hoet B, Lievens M. Development and Technical and Clinical Validation of a Quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Human Antibodies to Hepatitis B Surface Antigen in Recipients of Recombinant Hepatitis B Virus Vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009 Aug;16(8):1236-1246.[cited 2011 Sep 2]
24. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010 Aug;58(4):258-266.
25. Pujol FH, Navas M-C, Hainaut P, Chemin I. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 2009 Dec;286(1):80-88.[cited 2011 Aug 16]
26. Chotiyaputta W, Lok ASF. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009 Aug;6(8):453-462.[cited 2011 Sep 2]
27. Echevarría JM, Avellón A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J. Med. Virol.* 2006;78 Suppl 1:S36-42.[cited 2011 Sep 2]
28. Ohnuma H, Machida A, Okamoto H, Tsuda F, Sakamoto M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Allelic subtypic determinants of hepatitis B surface antigen (i and t) that are distinct from d/y or w/r. *J Virol* 1993 Feb;67(2):927-932.
29. Tong W, Sun L, He J, He S, Du F. A novel nucleotide insertion in S gene of hepatitis B virus in a

chronic carrier. *Virol J* [date unknown];7:104-104.

30. Zekri A-RN, Hafez MM, Mohamed NI, Hassan ZK, El-Sayed MH, Khaled MM, Mansour T. Hepatitis B virus (HBV) genotypes in Egyptian pediatric cancer patients with acute and chronic active HBV infection. *Virol J* [date unknown];4:74-74.
31. Huy TT-T, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Shrestha PK, Zhong Z-H, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K. High Prevalence of Hepatitis B Virus Pre-S Mutant in Countries Where It Is Endemic and Its Relationship with Genotype and Chronicity. *J. Clin. Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5449-5455.[cited 2011 Sep 2]
32. Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *Journal of General Virology* 2000 May;81(5):1165 -1174.[cited 2011 Aug 16]
33. Leblebicioglu H, Eroglu C. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004 Jun;10(6):537-541.[cited 2011 Sep 2]
34. Sayan M, Akhan S, Bozdayı M. Genotype A2/adw2 Strain of Hepatitis B Virus in Turkey: A Case Report. *Hepatitis Monthly* 2010;10(4):302-305.
35. Güven R, Ozcebe H, Cakir B. Hepatitis B prevalence among workers in Turkey at low risk for hepatitis B exposure. *East. Mediterr. Health J.* 2006 Nov;12(6):749-757.[cited 2011 Sep 2]
36. Değertekin H, Yalçın K, Yakut M. The prevalence of hepatitis delta virus infection in acute and chronic liver diseases in Turkey: an analysis of clinical studies. *Turk J Gastroenterol* 2006 Mar;17(1):25-34.[cited 2011 Sep 2]
37. Ly TD, Servant-Delmas A, Bagot S, Gonzalo S, Ferey M-P, Ebel A, Dussaix E, Laperche S, Roque-Afonso A-M. Sensitivities of Four New Commercial Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Assays in Detection of HBsAg Mutant Forms. *J. Clin. Microbiol.* 2006 Jul;44(7):2321-2326.[cited 2011 Sep 2]
38. Scheiblaue H, El-Nageh M, Diaz S, Nick S, Zeichhardt H, Grunert H -P, Prince A. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. *Vox Sanguinis* 2010 Apr;98(3p2):403-414.[cited 2011 Sep 2]
39. Ismail N, Fish GE, Smith MB. Laboratory Evaluation of a Fully Automated Chemiluminescence Immunoassay for Rapid Detection of HBsAg, Antibodies to HBsAg, and Antibodies to Hepatitis C Virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004 Feb;42(2):610-617.[cited 2011 Sep 2]
40. Wolters G, Nelissen P, Kuijpers L. Improved ELISA for the detection of HBsAg. *Journal of Virological Methods* 1985 Apr;10(4):299-305.[cited 2011 Aug 18]
41. Yuan Q, Ge S-xiang, Yan Q, Zhao Y, Xiong J-hui, Zhang J, Xia N-shao. [Establishment of a new combined enzyme immunoassay for detection of HBV preS1 and core antigens and the consistency with HBV DNA test]. *Bing Du Xue Bao* 2007 Jul;23(4):252-257.[cited 2011 Aug 30]

42. Deguchi M, Kagita M, Asari S, Iwatani Y, Tsuchida T, Iinuma K, Sanborn M. [Evaluation of seven immunological assay reagents for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) in the sensitivity and the detection of HBsAg mutants]. *Kansenshōgaku Zasshi* 2005 Feb;79(2):138-142.[cited 2011 Aug 17]
43. Weber B, Bayer A, Kirch P, Schluter V, Schlieper D, Melchior W. Improved Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen by a New Rapid Automated Assay. *J. Clin. Microbiol.* 1999 Aug;37(8):2639-2647.[cited 2011 Sep 2]
44. Weber B, Dengler T, Berger A, Doerr HW, Rabenau H. Evaluation of Two New Automated Assays for Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Detection: IMMULITE HBsAg and IMMULITE 2000 HBsAg. *J. Clin. Microbiol.* 2003 Jan;41(1):135-143.[cited 2011 Sep 2]
45. Ali A, Pearce S, Coleman P. Factors affecting immunodetection of hepatitis B surface antigen recombinant mutants. *Journal of Medical Virology* 2007 Jan;79(S1):S47-S51.[cited 2011 Aug 17]
46. Scheiblaue H, Soboll H, Nick S. Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. *J. Med. Virol.* 2006;78 Suppl 1:S66-70.[cited 2011 Sep 5]
47. Dufour DR. Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Assays--Are They Good Enough for Their Current Uses? *Clin Chem* 2006 Aug;52(8):1457-1459.[cited 2011 Aug 17]