

Evaluación del estuche de diagnóstico ImmunoLISA™ HBsAg 1 Step fabricado por Orgenics LTD para la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

Ma. del Carmen Basualdo-Sigales,* Patricia Amalia Alcántara-Pérez,**
Carmen Soler-Claudín*

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo de tercera generación para la detección en suero o plasma del antígeno de superficie (HBsAg) del virus de la hepatitis B: ImmunoLISA™ HBsAg 1 Step fabricados por Orgenics LTD. Para este fin se utilizó un panel de 200 muestras preevaluadas con el estuche UMELISA HBs Ag PLUS para la detección de HBsAg, fabricado por el Centro de Inmunoensayo de La Habana Cuba. Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras repetidamente positivas se sometieron a confirmación y se encontró que el ensayo tenía especificidad del 100%, sensibilidad de 96.3%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 99.4%. Los resultados sustentan la utilización de este estuche para realizar diagnóstico de exposición al virus de hepatitis B e igual que con el resto de los estuches de tamizaje disponibles, se sugiere la realización de estudios de confirmación para asegurar la veracidad de los resultados.

Palabras clave: HBsAg, diagnóstico, hepatitis B, antígeno de superficie de hepatitis B, ELISA.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of the third generation ELISA for qualitative determination of hepatitis B surface antigen (HbsAg) in human plasma or serum: ImmunoLISA™ HBsAg 1 Step by Orgenics LTD. We use a panel of 200 pre-evaluated plasmas with UMELISA HBs Ag PLUS by Centro de Inmunoensayo de La Habana Cuba. Assay protocols were followed according the manufacturer. All twice positive samples were assayed for confirmatory test. The assay showed 100% specificity, 96.3% sensitivity, 100% positive predictive value and 99.43% negative predictive value. Our results support the use of this assay as a screening test for hepatitis B and as is suggested for all screening test a confirmatory assay must be performed to assure accurate results.

Key words: HbsAg, hepatitis B surface antigen, hepatitis B diagnosis, ELISA.

INTRODUCCIÓN

La infección con el virus de la hepatitis B (VHB) es la causa más común de hepatitis viral en el mundo. La Organización Mundial de la Salud la define como

un serio problema de salud pública y estima que 2 mil millones de personas se han infectado en el VHB y que 360 millones de personas están crónicamente infectadas, la mayoría de ellas en el tercer mundo.¹ La infección se adquiere igual que el virus de inmunode-

* Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

** Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud.

Correspondencia:

Ma. del Carmen Basualdo Sigales. Departamento de Biología Celular y Fisiología. Edificio B Laboratorio 215. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior Ciudad Universitaria.
E-mail: mcbasualdo@yahoo.com, mcbasualdo@biomedicas.unam.mx.

Recibido: 22-11-2007

Aceptado: 15-07-2008

ficiencia humana (VIH) por transfusión sanguínea, por agujas no esterilizadas, verticalmente de la mamá al bebé o sexualmente, sin embargo el virus de la hepatitis B es 50 a 100 veces más infeccioso que el VIH. El periodo de incubación de la enfermedad es de 4 semanas a 4 meses. En el mundo se han distinguido zonas de alta prevalencia como Asia con más del 8%, zonas de prevalencia intermedia (2-7%) como África Sub-Sahariana, Alaska y el Mediterráneo, y zonas de prevalencia baja como México, Centroamérica y Sudamérica (menos del 2%). Estudios recientes en México reportan una frecuencia entre 0.07 y 0.16% en el marcador de antígeno de superficie (HBsAg).²⁻⁵

El VHB pertenece a la familia *Hepadnaviridae* y es un virus envuelto cuyo genoma es ADN de doble cadena. La envoltura externa está compuesta por una bicapa lipídica obtenida por gemación de la membrana celular del hepatocito durante el ciclo replicativo del virus y glicoproteínas de la envoltura viral: grande (L), mediana (M) y pequeña o principal (S). Esta última denominada antígeno de superficie (HBsAg). Es el componente mayoritario de las partículas vacías, llamadas así porque son envolturas incompletas alargadas o esféricas en donde no se detecta ADN viral y desde el punto de vista diagnóstico es la proteína más importante. El HBsAg está compuesto de 226 aminoácidos, de los cuales los colocados entre la posición 100 y 160 constituyen el llamado determinante "a". El determinante "a" representa la región inmunodominante del HBsAg. Alteraciones en los residuos de aminoácidos en esta región pueden reducir la antigenicidad y el nivel de expresión de proteínas. La mayoría de los anticuerpos que se generan contra el HBsAg durante la infección por el VHB así como tras la vacunación con HBsAg nativo o recombinante, reconocen con mayor o menor afinidad el determinante antigénico "a". Se sabe que los anticuerpos neutralizantes generados durante la infección están dirigidos principalmente al determinante antigénico "a".⁶ Por lo anteriormente expuesto los equipos comerciales de diagnóstico utilizan anticuerpos dirigidos al determinante "a".

El diagnóstico inicial de la infección aguda o crónica por el VHB se basa en la detección del HBsAg en el suero o el plasma. El HBsAg es ya detectable en la sangre durante el periodo de incubación de la hepatitis aguda, entre 2-7 semanas antes de que se manifiesten los primeros signos y síntomas de la enfermedad; su aparición en la sangre precede en 2-4 semanas a la elevación de los niveles séricos de las transaminasas. En la mayoría de los casos, el HBsAg continúa siendo detectable durante la fase sintomática

de la enfermedad, para dejar de serlo poco después, coincidiendo con la seroconversión de los anticuerpos anti-HBs, ya en la fase de convalecencia (2-3 meses después de la infección). En menos de un 5% de los casos, el HBsAg es eliminado rápidamente de la circulación y no se detecta durante la fase sintomática de la enfermedad.

Actualmente la detección del HBsAg se lleva a cabo mediante enzimoimmunoanálisis (EIA) comerciales tipo sandwich, los cuales han sustituido al clásico radioinmunoanálisis (RIA). Los distintos ensayos comerciales que detectan el HBsAg difieren entre sí, esencialmente en la naturaleza de la fase sólida: micropartículas de poliestireno, micropartículas magnéticas, pocillos de placas de poliestireno o membranas de nitrocelulosa (ensayos inmunocromatográficos) y en el tipo de anticuerpo de captura: monoclonal (en los ensayos de tercera generación) o policlonal o bien la combinación de ambos.⁷

Estudios sobre el curso natural de la infección por VHB han demostrado que la fase aguda se resuelve espontáneamente en más del 90% de los pacientes dentro de los primeros 6 meses postinfección. Menos del 10% de los pacientes infectados con VHB desarrollan hepatitis crónica.⁸ La probabilidad de progresión de infección aguda a crónica depende en parte de cuando ocurre la infección. La tasa más alta de cronicidad se ha observado como consecuencia de infección perinatal (90%); estos individuos permanecen asintomáticos durante la fase aguda, sin embargo tienen más riesgo de presentar estado de portador crónico y eventualmente evolucionar a cirrosis hepática y cáncer.⁹⁻¹⁰ El antígeno e (HBeAg) sintetizado como precursor de la proteína del *core*¹¹⁻¹² es un marcador de alta replicación viral en el hígado, tiene una tasa de seroconversión de 10 a 15% por año. La pérdida de HBeAg en suero se asocia con mejoría del paciente, normalización de los niveles de aminotransferasa y disminución de la inflamación hepática. La hepatitis fulminante se desarrolla en menos del 1%. La cirrosis de hígado se encuentra en menos del 1% de todos los pacientes infectados. El carcinoma hepatocelular se observa casi exclusivamente en pacientes con hepatitis crónica avanzada o cirrosis, especialmente si hay otros factores como el consumo de alcohol, coinfección con el virus de hepatitis C o ingestión de aflatoxinas. La persistencia por más de 6 meses del HBsAg refleja un estado de portador crónico del virus de hepatitis B.¹³

El tamizaje para HBsAg permite la identificación de pacientes infectados, ayuda al seguimiento de

los pacientes y a entender la epidemiología de la enfermedad en el mundo, además ha permitido disminuir considerablemente el riesgo de infección por transfusión.

Las pruebas moleculares son útiles para el manejo clínico de los pacientes: cuantificación de la carga viral, genotipificación, resistencia a fármacos y detección de mutantes.

Por las razones antes expuestas nos pareció importante evaluar un ELISA de tercera generación para la detección del antígeno de superficie del VHB que se puede realizar con poco equipo de laboratorio y en un tiempo razonablemente corto. El estuche ImmunoLISA™ HBsAg 1 step fabricado por Orgenics -LTD para detección del antígeno de superficie fue VHB evaluado comparándolo con UME-LISA HBs Ag PLUS para la detección de HBsAg, fabricado por el Centro de Inmunoensayo de La Habana, Cuba como ensayo de referencia. UMELISA tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad de 99.92% con capacidad de detectar 0.325 UI/mL como mínimo en este tipo de muestras. Este nivel de detección está dentro de los requerimientos de la FDA (0.2-1 UI/mL) para este tipo de ensayos de diagnóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Panel de muestras

Fueron codificadas con numeración secuencial, 200 muestras de suero preevaluadas y conservadas en congelación a -20°C. De estas muestras, 27 eran positivas confirmadas (utilizando HBsAg *confirmatory test* fabricado por el Centro de Inmunoensayo de La Habana, Cuba) y 173 eran negativas.

Todas las muestras se corrieron en el estuche ImmunoLISA™ (Orgenics, Israel) siguiendo las indicaciones dadas en el inserto. Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de la Unidad de Diagnóstico y Referencia en VIH UNAM/SSDF entre el 5 y el 24 de Octubre de 2006.

Las muestras que resultaron reactivas en ImmunoLISA™ HBsAg se volvieron a correr y aquellas que volvieron a dar valores positivos se confirmaron utilizando el estuche ImmunoLISA HBsAg *confirmation* de Orgenics, según indicaciones del fabricante. Al final se compararon los resultados de cada muestra con los resultados obtenidos con el estuche de referencia (UMELISA). Por último, se determinaron la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo y negativo del ensayo.

Fundamento del ensayo

ImmunoLISA™ HBsAg 1 step es una prueba de ELISA competitivo en la cual anticuerpos monoclonales específicos para HBsAg que incluyen el determinante "a", común a todos los subtipos virales conocidos, han sido fijados en los pozos de la placa. El suero o plasma de los pacientes se adiciona junto con un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano y dirigido contra un epítipo diferente. Los complejos específicos formados con el HBsAg de la muestra son capturados en la fase sólida. Al final de la incubación, los lavados permiten remover proteínas inespecíficas no unidas a los pozos y restos del conjugado. En presencia del inmunocomplejo HBsAg, la combinación sustrato-cromógeno que es incolora se hidroliza a un producto colorido azul que se torna amarillo al bloquear la acción enzimática con ácido. La densidad óptica (DO) a 450 nm es directamente proporcional a la cantidad de HBsAg presente en la muestra.

La interpretación de los resultados fue conforme lo indica el fabricante en el inserto del estuche. La línea de corte se obtuvo sacando el promedio de los valores de DO 450 nm de los 3 controles negativos más 0.050 (*Cuadro I*).

Línea de corte = Promedio de controles negativos + 0.050

El principio del método de confirmación es la neutralización con anticuerpos anti HBsAg del antígeno presente en la muestra reactiva. Si la reactividad obtenida en el ensayo de tamizaje es específica para la presencia de HBsAg, habrá neutralización del Ag, de lo contrario, la reactividad inicial no es específica para HBsAg en la muestra y por tanto la neutralización no se llevará a cabo.

La positividad de la muestra es confirmada como específica con este ensayo si el radio de DO a 450 nm del pozo control (sin anticuerpos neutralizantes) entre el valor de DO a 450 nm del pozo neutralizado es mayor que 2 (DO 450 nm control/DO 450 nm neutralizado > 2).

Cuadro I. Interpretación del ImmunoLISA™ HBsAg 1 step.

DO 450 nm de la muestra/Línea de corte	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 a 1.1	Equívoco (repetir ensayo)
> 1.1	Positivo

Técnicas

Todas las muestras se procesaron en estuches ImmunoLISA™ HBsAg 1 step de un mismo lote conforme a las indicaciones del inserto del fabricante. La placa se lavó una vez con amortiguador de lavado, previamente al ensayo. El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. El pozo A1 se marcó como blanco. Los pozos B1, C1 y D1 se usaron para controles negativos incluidos en el estuche (150 μ L). Los pozos E1 y F1 se usaron para el calibrador (0.5 ng/mL de HBsAg) incluido en el estuche (150 μ L) y en el pozo G1 se puso el control positivo también incluido en el estuche (150 μ L).
2. A partir del pozo H1 se colocaron las muestras 150 μ L de plasma y 100 μ L del conjugado peroxidasa - anticuerpo anti HBsAg específico a un epítipo del determinante "a" diluido 1:20 con su propio amortiguador de dilución según lo indica el fabricante.
3. Se cubrió la placa con cinta adhesiva y se incubó a 37°C por 120 min.
4. Terminado el tiempo de incubación se procedió a lavar la placa 4 veces en un lavador automático con amortiguador de lavado diluido 1X (incluido en el estuche en concentración 20X).
5. Se adicionaron 200 μ L de sustrato/cromógeno (incluido en el estuche). Y se incubó en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente.
6. Al final de este tiempo se paró la reacción con ácido sulfúrico 0.3M (incluido en el estuche) y se procedió a leer la DO en un lector Multiskan Ascent (Labsystems, Finlandia) a 450 nm con filtro de referencia a 620 nm.
7. Se hicieron los cálculos para obtener la línea de corte como se indicó antes y se interpretaron los resultados conforme las indicaciones del inserto.
8. Las muestras positivas en dos ocasiones se sometieron a confirmación con el estuche ImmunoLISA™ HBsAg confirmation. Todas las muestras con DO a 450 nm mayor a 2 en la prueba inicial fueron diluidas 1:100 y 1:10,000; 150 μ L de cada dilución se incubó por separado con 50 μ L de reactivo neutralizante y con 50 μ L de reactivo control.
9. Se incubaron directamente sin diluir, 150 μ L de las muestras cuya DO a 450 nm fue inferior a 2 en la primera determinación, en 2 tubos con 50 μ L de reactivo neutralizante y con 50 μ L de reac-

tivo control respectivamente. El calibrador también se incubó con suero neutralizante.

10. Terminada esta incubación se procedió al ensayo de ELISA en ImmunoLISA™ HBsAg 1 step como se indica en los pasos 1 a 7. En el pozo E1 se colocó calibrador incubado con suero control y en F1 calibrador incubado con suero neutralizante.
11. Los resultados se calculan dividiendo la DO a 450 nm de la muestra incubada con suero control entre la DO a 450 nm de la muestra incubada con suero neutralizante, considerándose confirmación positiva si esta relación es igual o mayor a 2.

Análisis estadístico

Como medida descriptiva se obtuvieron las frecuencias. Para la evaluación del estuche se hizo el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo (la probabilidad de que los sujetos con resultado positivos tengan hepatitis B) y negativo (la probabilidad de que quienes tienen una prueba negativa estén sanos), según las fórmulas mostradas en el *cuadro II*. Así mismo, se calcularon los intervalos de confianza al 95%.

RESULTADOS

En el *cuadro III* se muestran los resultados de las 200 muestras tanto en UMELISA HBs Ag PLUS como en el estuche ImmunoLISA™ HBsAg 1 step de Organics. Cuarenta y un muestras dieron valor positivo en la primera corrida de ImmunoLISA™ HBsAg 1 step. Todas ellas se corrieron en un segundo ensayo y trece fueron negativas, por lo que no se sometieron a confirmación y se consideraron negativas. Veintiocho muestras que repitieron con valor positivo se sometieron al ensayo de confirmación y 26 de ellas fueron confirmadas positivas específicamente a HBsAg. La muestra 179 repetidamente positiva en ImmunoLISA™ HBsAg 1 step no confirmó como positiva aun y cuando en UMELISA HBs Ag PLUS si fue positiva confirmada. Sin embargo al revisar información enviada por los fabricantes encontramos que ellos aclaran que en la prueba de confirmación ImmunoLISA™ HBsAg confirmation la DO a 450 nm del pozo control debe ser superior a 0.2 para que los resultados de confirmación sean útiles. En el caso de la citada muestra, los controles están por debajo de 0.2 y como el inserto del estuche no hace esta aclaración, la incluimos en el análisis de resultados. La muestra número 25 fue repetidamente positiva en ImmunoLISA™ HBsAg 1 step; sin embargo, la confir-

Cuadro II. Fórmulas utilizadas para el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

Parámetro	Fórmula
Sensibilidad	$\left[\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \right] \times 100$
Especificidad	$\left[\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \right] \times 100$
Valor predictivo positivo	$\left[\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}} \right] \times 100$
Valor predictivo negativo	$\left[\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos negativos}} \right] \times 100$

Cuadro III. Resultados obtenidos de la evaluación del estuche ImmunoLISA™ HBsAg 1 step de Orgenics.

Resultado de la prueba	UMELISA	Orgenics
Positivos	27	26
Negativos	173	173
Falsos positivos	0	0
Falsos negativos	0	1

mación fue negativa. Esta muestra era negativa en UMELISA.

Ninguna de las muestras negativas en UMELISA resultó positiva confirmada en ImmunoLISA™ HBsAg 1 step.

Haciendo los cálculos correspondientes obtuvimos una especificidad del 100%, sensibilidad de 96.3% (IC95%: 94 – 98%), valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 99.4% (IC95%: 98 – 100%).

DISCUSIÓN

En los laboratorios clínicos es importante contar con metodologías confiables y sencillas que permitan emitir resultados seguros. La infección por virus de la hepatitis B ha impactado a una proporción significativa de individuos en el mundo, por lo cual la detección de esta infección es importante en los bancos de sangre, entre los individuos infectados con VIH y, en general, entre toda persona sometida a algún riesgo de infección por virus de hepatitis B.

El estuche ImmunoLISA™ HBsAg 1 step de Orgenics es un ELISA sencillo y relativamente rápido. Dadas las características del ensayo es muy recomendable para bancos de sangre y laboratorios donde el volumen de muestras sea considerable. Las indicaciones del inserto del estuche son claras y si se siguen correctamente los datos de sensibilidad y especificidad son aceptables y pudieran ser mejores si el inserto aclarara la necesidad de repetir la confirmación cuando los valores de DO de la dilución 1:100 del control están por debajo de 0.2 de DO a 450 nm. La muestra que fue positiva confirmada con UMELISA tuvo valores muy bajos, sin embargo, aunque es repetidamente positiva en ImmunoLISA™ HBsAg 1 step con valores de DO a 450 nm superiores de 2, no confirma en ImmunoLISA™ HBsAg confirmation. Los valores de DO en las muestras diluidas 1:100 y 1:100,000 y tratadas con reactivo control son muy bajos (0.19 y 0.125 respectivamente), aunque el inserto de la prueba de confirmación no aclara que no son interpretables los resultados si el valor de DO a 450 nm de los pozos control está por debajo de 0.2, por lo que decidimos incluirla en el análisis de resultados. Por otro lado, la literatura nos indica que alteraciones de residuos de aminoácidos en el determinante "a" pueden resultar en reducción de la antigenicidad del HBsAg. Por ejemplo la sustitución Gly/Arg 145 altera la proyección del asa entre los aminoácidos 139 y 147, lo cual da como consecuencia que los anticuerpos neutralizantes no son capaces de reconocer el epítipo mutante, o lo reconocen de modo parcial.⁶ Es interesante destacar que se ha observado que los equipos comer-

ciales que utilizan anticuerpos monoclonales para captura y policlonales para detección son capaces de detectar la mutante más común HBsAg Gly 145 Arg, no así los estuches que utilizan monoclonales para captura y detección.¹⁴ Una posible mutación en esta zona en la muestra 179 pudiera ser otra explicación de porqué no hay neutralización.

Nuestros datos indican que para evitar errores es fundamental repetir el ensayo en las muestras positivas, así como realizar la confirmación de las muestras repetidamente positivas antes de emitir algún resultado. En el caso de que la muestra tenga inicialmente un valor de DO a 450 nm mayor a 2, pero en la dilución 1:100 incubada con el reactivo control tenga DO a 450 nm menor de 0.2, conviene realizar la confirmación con una dilución menor a fin de asegurarse de que el ensayo está dando resultados correctos. Se recomendaría que el fabricante incluyera este dato en su inserto de confirmación.

Los resultados de este trabajo sustentan la utilización del estuche para realizar diagnóstico de exposición al VHB, e igual que con el resto de los estuches de tamizaje disponibles, se sugiere la realización de estudios de confirmación para asegurar la veracidad de los resultados.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. *Hepatitis B*. (Fact sheet no. 204.) Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000.
2. Silveira TR, Fonseca JC, Rivera L. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 1999; 6: 378-83.
3. Ayala-Gaytán JJ, Guerra-Avalos FJ, Mora-Brondo P. Prevalence of viral markers for hepatitis B, C and human immunodeficiency virus in volunteer blood donors in Northeast Mexico. *Rev Gastroenterol Mex*. 1997; 62: 250-3.
4. Carreto-Vélez MA, Carrada-Bravo T, Martínez-Magdaleno A. Seroprevalence of HBV, HCV, and HIV among blood donors in Irapuato, Mexico. *Salud Publica Mex*. 2003; 45(Supl 5): S690-3.
5. Rivera-López MR, Zavala-Méndez C, Arenas-Esqueda A. Prevalence for seropositivity for HIV, hepatitis B and hepatitis C in blood donors. *Gac Med Mex*. 2004; 140: 657-60.
6. Coleman PF. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 198-203.
7. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 428.
8. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis*. 1985; 151: 599-603.
9. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*. 2006; 43: S173-S181.
10. Mast EE, Margolis HS, Fiore AE. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR Recomm Rep*. 2005; 54(RR-16): 1-31.
11. Guidotti LG, Matzke B, Pasquinelli C, Shoenberger JM, Rogler CE, Chisari FE. The hepatitis B virus (HBV) precore protein inhibits HBV replication in transgenic mice. *J Virol*. 1996; 70: 7056-61.
12. Lamberts C, Nassal M, Velhagen I, Zentgraf H, Schroder CH. Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J Virol*. 1993; 67: 3756-62.
13. Carman W F, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*. 1989; 334: 588-91.
14. Louisirirothanakul S, Kanoksinsombat C, O'Charoen R, Fongsatikul L, Paupairoj C, Lulitanond V, et al. HBsAg diagnostic kits in the detection of hepatitis B virus mutation within "a" determinant. *Viral Immunol*. 2006; 19: 108-14.