

DETERMINAÇÃO DO LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA DE PCR "NESTED" PARA O VÍRUS DA HEPATITE B (HBV)*EVALUATION OF MINIMUM DETECTION LIMIT TO HEPATITIS B VIRUS (HBV) PCR "NESTED"*

Tiago Bottin Coser^{1,2}, Marisa Chesky¹, Fernanda de-Paris¹, Afonso Luis Barth¹, Virginia Minghelli Schmitt², Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado¹

RESUMO

Mundialmente, a hepatite pelo vírus B (HBV) é considerada um dos maiores problemas de saúde pública, apesar da vacinação. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 2 bilhões de pessoas estejam infectadas pelo HBV. O Brasil é classificado como área de incidência intermediária pela OMS. No entanto, estudos de prevalência detectaram diferenças de índices de infecção nas regiões geográficas: 8% na região Amazônica, 2,5% nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, 2% na Sudeste e 1% na região Sul. Um diagnóstico sensível e específico é de fundamental importância para os pacientes portadores do HBV. O objetivo deste estudo foi determinar o limite mínimo de detecção da técnica de PCR "nested" "in house" para o HBV. Diluições seriadas de uma amostra quantificada de HBV (1000 cópias/mL; 750 cópias/mL; 500 cópias/mL; 250 cópias/mL) foram submetidas à técnica de PCR "nested". O alvo da amplificação por PCR foi a região do core e pré-core do vírus. Para extração dos ácidos nucleicos da amostra foi empregado o kit comercial QiAmp. O limite mínimo de detecção encontrado foi de 500 cópias/mL ou 10 cópias por reação de PCR.

Unitermos: HBV, PCR, limite mínimo de detecção.

ABSTRACT

All over the world, the hepatitis B virus (HBV) is considered one of the major problems of public health, despite vaccination. World Health Organization (WHO) estimates that more than 2 billions of persons are infected by HBV. Brazil is classified as an area of intermediary incidence by WHO. However, prevalence studies have detected differences of infection indexes in geographic regions: 8% in the Amazonian region, 2,5% in middle-west and Northeast, 2% in Southeast and 1% in South. A sensitive and specific diagnosis is very important to the HBV carrier patients. The aim of this study was to determine the minimum limit of detection of the nested PCR in house technique for HBV. Serial dilutions of one quantified sample of HBV (1000 copies/mL; 750 copies/mL; 500 copies/mL; 250 copies/mL) were submitted to a nested PCR. The target of PCR was viral core and pre-core region. Commercial kit, QiAmp, was employed to purify nucleic acids from the sample. The minimum detection limit found was 500 copies/mL or 10 copies per PCR reaction.

Keywords: HBV, PCR, minimum detection limit.

Rev HCPA 2008;28(1):5-9

A hepatite é uma doença conhecida desde a antiguidade e descrita inicialmente no século V a.C. Em 1947, MacCallum e Bauer introduziram os termos "hepatite A" para "hepatite infecciosa", transmitida pela rota fecal-oral, com período de incubação de 2 a 6 semanas infectando principalmente crianças e "hepatite B" para "hepatite do soro", sendo então constatado que a epidemiologia destas doenças era diferente. Em 1965, com a descoberta no soro do antígeno Austrália por Blumberg et al., o vírus da hepatite B foi identificado e caracterizado. O antígeno presente na superfície da partícula viral foi designado HBsAg e associado com as infecções aguda e crônica (1).

A hepatite pelo HBV é a nona causa de morte no mundo (2), sendo ainda considerada um dos maiores problemas de saúde pública, apesar da vacinação. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 2 bilhões de pessoas estejam infectadas pelo HBV. Em 2000, o número de portadores crônicos era de 350 milhões de pacientes (75% na Ásia e no Oeste do Pacífico), causando 500 mil a 1 milhão de mortes por ano (1,3,4). O Brasil é classificado como área de incidência intermediária pela OMS, no entanto, estudos de prevalência detectaram diferenças de índices de infecção nas

regiões geográficas: 8% na região Amazônica, 2,5% nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, 2% na Sudeste e 1% na região Sul (5).

O HBV causa hepatite aguda ou crônica, que pode evoluir para cirrose ou hepatocarcinoma celular. O vírus está presente no sangue de indivíduos infectados, tanto na fase aguda da doença quanto na forma crônica e durante o período de convalescência. A transmissão ocorre por via sanguínea, através de relações sexuais, compartilhamento de seringas e de mãe para filho (1,2,3,4,5).

O invólucro, que reveste externamente o capsídeo viral é formado pelo antígeno HBsAg. Os antígenos de superfície (HBsAg), do core (HBcAg) e HBeAg e os anticorpos específicos produzidos contra estes antígenos (anti-HBs, anti-HBc e anti-HBe) são utilizados como marcadores sorológicos para diagnóstico laboratorial da infecção pelo HBV. O perfil destes marcadores sorológicos permite definir qual a fase de infecção (1,4).

O antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) é o primeiro marcador a aparecer, geralmente precede a hepatite clinicamente evidente, e também está presente no portador crônico. No caso de evolução para cura, o antígeno desaparece do sangue em menos de 6 meses. O anticorpo específico é o anti-HBs, que aparece

¹ Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

² Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

Correspondência: Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado, Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP: 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: 55 51 2101-8860. E-mail: abmachado@hcpa.ufrgs.br

entre 1 e 4 meses após o início dos sintomas, indicando imunidade para o HBV (4,5,6,7).

O antígeno HBe (HBeAg) é detectado logo após o aparecimento do HBsAg, sua presença indica replicação viral ativa (associada com a detecção do DNA do HBV no soro) e sua positividade por 8 a 12 semanas indica o desenvolvimento da hepatite B crônica. O anticorpo específico para HBeAg é o anti-HBe, que durante o estágio agudo da infecção e soroconversão é prognóstico de resolução de infecção. A presença do anti-HBe era associada com a suspensão da replicação viral no fígado e baixa infecção no soro. Entretanto, estudos têm demonstrado que pacientes que são HBeAg negativos e frequentemente também anti-HBe negativo ou positivos (com presença de vírus selvagem e vírus com mutação) podem apresentar replicação viral associada com variantes contendo mutações na região pré-core do HBV (8,9,10). A mutação mais frequente introduz um códon de parada, impedindo a expressão do HBeAg (9,11). O HBV mutante é predominantemente encontrado na região do Mediterrâneo, nos países da Grécia, Itália e Israel com frequência de 50 a 80% e em países da Ásia, como Hong Kong, Taiwan e Japão com frequência de 40 a 55% (12). Em um estudo brasileiro de 2005, foi relatada prevalência de 36% de mutação no nucleotídeo 1896 do genoma viral em pacientes com hepatite B crônica (13). Os vírus com mutação na região do pré-core foram identificados em pacientes com hepatite fulminante ou crônica, bem como em pacientes assintomáticos (4,13).

O HBeAg é um antígeno intracelular não identificado no soro, mas é expresso nos hepatócitos e induz uma resposta imune das células T (14). O anticorpo tipo IgM contra o core do vírus da hepatite B (anti-HBc IgM) aparece no início da hepatite clínica e pode ser o único marcador sorológico do tipo agudo presente em alguns pacientes. O paciente com hepatite B crônica pode apresentar o anti-HBc IgM em baixa concentração no soro, não sendo detectado nestas circunstâncias. Com o declínio dos níveis de anti-HBc IgM, entre 4 a 6 meses todo o anti-HBc presente no sangue é do tipo IgG que pode persistir por toda a vida, indicando um episódio de infecção presente ou passada pelo HBV (4,5,6,7).

Os principais métodos de diagnóstico laboratorial da hepatite B, além dos marcadores sorológicos, são os moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a hibridização. Os testes moleculares, devido à detecção direta do antígeno, são marcadores para replicação viral (1). Os níveis de HBV DNA no soro ou plasma têm mostrado correlação com os achados bioquímicos e histológicos de hepatite B (16). Conseqüentemente, a detecção do DNA viral tem um papel importante na avaliação e no monitoramento terapêutico da infecção pelo HBV. A PCR é uma técnica mais sensível que a hibridização, podendo detectar até 10 genomas virais/mL (7,10). A vantagem de utilizar métodos moleculares está na detecção sensível e direta do genoma viral, mesmo nos vírus mutantes (9,14,15).

Os kits comerciais baseados em amplificação do genoma viral apresentam custo elevado e seu uso na rotina de diagnóstico apresentaria um ônus financeiro importante. Alguns kits não têm registro na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), portanto não

são comercializados para uso clínico-laboratorial. Uma maneira de utilizar o diagnóstico molecular para o HBV sem o uso de kits comerciais é a padronização de técnicas pelo próprio laboratório de diagnóstico, as chamadas técnicas "in-house". Foi desenvolvida no Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 1999, no laboratório de Biologia Molecular uma técnica "in house" de PCR "nested" que amplifica a região core/pré-core do genoma viral. Esta técnica é qualitativa e atualmente faz parte da rotina de diagnóstico.

Quando o laboratório não utiliza técnica comercial para detecção de HBV a definição do limite mínimo de detecção das técnicas moleculares deve ser desenvolvida e otimizada pelo próprio laboratório, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados. O objetivo deste estudo foi determinar o limite mínimo de detecção da técnica de PCR "nested" "in house" para o vírus da hepatite B utilizada na rotina de diagnóstico no laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

METODOLOGIA

Foram realizadas 4 diluições (1000 cópias/mL; 750 cópias/mL; 500 cópias/mL; 250 cópias/mL) de uma amostra de soro de concentração conhecida (de 2000 cópias/mL) de DNA do HBV, determinada pelo método de PCR usando o kit Amplicor Roche® de quantificação de HBV-DNA. A amostra foi gentilmente cedida pelo Laboratório Amplicon e armazenada durante o período de 2 meses em freezer a -20°C.

As diluições foram realizadas em água ultrapura (Sigma, Sant Louis, USA), em volume suficiente para todos os testes a serem realizados e foram testadas 9 vezes, em dias diferentes, para a comprovação da reprodutibilidade da técnica de PCR. Para a extração de DNA com 140µL de cada diluição, utilizou-se o Kit comercial QIAmp (Qiagen®, Valencia, USA), conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi removido das colunas QIAmp com 70µL de tampão de eluição, por centrifugação. As extrações, a partir das diluições do soro, foram repetidas 2 vezes para obtenção do volume suficiente de material extraído necessário para as 9 reações de PCR.

As amostras de DNA foram submetidas à técnica de PCR "nested", que utiliza duas reações de amplificação com dois pares de "primers" diferentes. Na primeira reação, os "primers" externos MDD2 (5' GCG AAG CTT GAG GAA TAA AGC CCC GTA AA 3') e HDM3 (5' GCG CTG CAG GAG TTG GGG AGG AGA TTA 3') produzem um amplicon viral de 771 pb (pares de base). Na segunda reação, os "primers" internos MDN5 (5' GCG CTG CAG GAG GCT GTA GGC ATA AAT 3') e HDB2 (5' GCG AAG CTT AGA TCT CTG GAT GCT GGA 3'), originam um fragmento de 377 pb, utilizando como DNA molde o amplicon da primeira reação (8).

Cada reação de PCR na primeira etapa continha 16mM (NH₄)₂SO₄, 67mM Tris-HCl (pH 8,8 à 25°C), 1,5mM MgCl₂, 0,01% (w/v) de Tween-20 (tampão de PCR, Southern Cross Biotechnology Ltd., Cape Town, South Africa), 200nM dNTP mix (ABgene®, Epsom, UK), 200pmol de "primers" externos (Invitrogen®, Carl-

bad, USA), 1,25 U de enzima Super-Therm DNA polimerase (Southern Cross Biotechnology Ltd., Cape Town, South Africa) e 10µL de cada diluição viral extraída. O volume final da reação foi de 50µL e a amplificação foi executada em termociclador PTC-100 (MJ Research™, Waltham, USA), utilizando-se um período de desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto e 40 segundos, seguido de 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 50°C e 30 segundos de polimerização a 72°C.

Na segunda reação de amplificação empregou-se o par de “primers” internos. Esta reação utilizou uma mistura idêntica a anterior excetuando-se que o volume total foi de 24µL e que foram utilizados 2µL do amplicon obtido na primeira reação de PCR como DNA alvo. O programa de amplificação constou de um período de desnaturação de 45 segundos a 94°C, seguido de 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 50°C e 30 segundos de polimerização a 72°C.

Os produtos finais das amplificações foram detectados por eletroforese utilizando-se 10µL da segunda reação em gel de agarose a 2%, contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio. A visualização foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta. Um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®, Carlsbad, USA) e um controle positivo para o HBV foram empregados para avaliar os produtos da PCR. Foi considerado o limite mínimo de detecção para cada diluição a maior diluição que ainda resultava em uma banda de DNA visível no gel de agarose correspondente ao peso molecular de 377 pares de base.

Os procedimentos de preparação dos reagentes, processamento da amostra, amplificação, transferência do produto da primeira para a segunda etapa de PCR e detecção do produto amplificado, foram realizados em quatro ambientes distintos para eliminar a possibilidade de contaminação. Além disso, foram utilizados ponteiras com filtros de barreira e controles negativos em cada reação.

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

Análise estatística

O cálculo de repetições para se avaliar o limite mínimo de detecção da técnica de PCR “nested” para o vírus da hepatite B foi estimado através do programa PEPI (versão 3.0). Para detectar uma diferença de 80% (considerando $\alpha=0,05\%$) entre as porcentagens de positividade das diferentes diluições, são necessárias 9 repetições de PCR para cada diluição da amostra.

O limite mínimo foi estabelecido através do teste Exato de Fischer para a comparação da positividade da diluição de 250 cópias/mL em relação às outras diluições, obtendo-se um $P < 0,001$.

RESULTADOS

Limite mínimo de detecção

O limite mínimo de detecção da reação de PCR “nested” para o vírus da hepatite B foi de 500 cópias/mL com 100% de positividade (Tabela 1). Utilizando 10µL

de DNA extraído das diluições de soro testadas na reação de PCR e corrigindo a concentração da amostra, o limite mínimo de detecção por reação foi de 10 cópias virais.

Tabela 1 - Porcentagem de positividade do limite mínimo de detecção.

Diluições	Amostras positivas (n=9 repetições)
250 cópias/mL	1 (11,1%)
500 cópias/mL	9 (100%)
750 cópias/mL	9 (100%)
1000 cópias/mL	9 (100%)

A presença de fragmentos específicos de 377 pb de HBV foram comparados com um controle positivo para o HBV e com um marcador de peso molecular de 100 pb (figura 1).

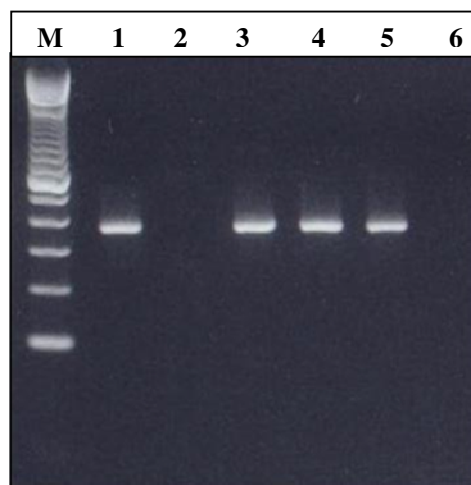


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 2 % mostrando os fragmentos da amplificação das diluições pesquisadas. 1- Controle positivo (377 pb) 2- Controle negativo 3- Diluição 1000 Cópias/mL (377 pb) 4- Diluição 750 Cópias/mL (377 pb) 5- Diluição 500 Cópias/mL (377 pb) 6- Diluição 250 Cópias/mL e M marcador peso molecular (100 pb).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento e aprimoramento dos métodos moleculares têm facilitado o diagnóstico das doenças infecciosas através da detecção do DNA do agente etiológico. Um diagnóstico sensível, específico e reprodutível é de importância fundamental para pacientes portadores da hepatite B. A técnica de PCR, como método de detecção do DNA do HBV é um indicador precoce da infectividade e da replicação viral, auxiliando no diagnóstico da infecção crônica, no monitoramento terapêutico e na terapia antiviral (17).

O presente estudo determinou o limite mínimo de detecção e obteve 500 cópias/mL para o vírus da hepatite B (HBV).

Gonçalves et al. (2003) determinaram o limite mínimo de detecção para o HBV “in house”, utilizando a reação de PCR “nested”, tendo como alvo a mesma região do core e pré-core do presente estudo, porém empregando seqüências diferentes de “primers”. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 2% com brometo de etídio por UV. O estudo obteve o limite mínimo de 100 cópias/mL (18).

Valentine-Thon et al. (1995) utilizaram a técnica de PCR “in house” com um par de “primers” da região que codifica o antígeno viral de superfície do HBV, resultando em um fragmento de 415 pb que foi identificado pelo mesmo método deste estudo. Os autores obtiveram um limite mínimo de detecção de 100 cópias/mL de HBV (19).

Chen et al. (2001) descreveram um método de PCR “in house” empregando “primers” marcados com biotina que amplificou um fragmento de 228 pb entre a região dos genes X e core. O amplicon foi detectado por hibridização com estreptavidina em microplacas de titulação pelo método de Elisa. O limite mínimo de detecção foi de 3730 cópias/mL (20).

Peng et al. (2005) descreveram um método “in house” de CD-PCR (*Competitively Differentiated Polymerase Chain Reaction*) para a detecção do HBV. Os fragmentos amplificados foram detectados com o uso de sondas de hibridização seguido pelo método de Elisa e o limite mínimo de detecção foi de 1.000 cópias/mL (21).

Em um estudo de proficiência europeia para a detecção molecular do vírus da hepatite B, onde 93 laboratórios de diversos países participaram, o limite mínimo de detecção para o HBV “in house” qualitativo simples oscilou entre 30 e 10.000 cópias/mL, enquanto que do PCR “nested” esteve entre 50 a 1.000 cópias/mL (22).

Os estudos citados acima mostram que o limite de detecção das reações de PCR “in house” pode variar muito dependendo de vários fatores (“primers”, enzima e métodos de detecção).

A sensibilidade da PCR “nested” “in house” apresentada neste estudo, foi de 500 cópias/mL ficando dentro dos valores encontrados na literatura e mostrou-se bastante reprodutível, pois apresentou o mesmo limite de detecção em 88,9% dos testes. Nos demais 11,1% o limite de detecção foi de 250 cópias/mL

Os kits comerciais para detecção para o DNA do HBV podem apresentar limite de detecção superior ao apresentado pela técnica em estudo. Por exemplo, o HBV Amplicor Roche, cujo limite mínimo de detecção é de 1000 cópias/mL (18).

A detecção e a quantificação do DNA do HBV no soro parecem ser ferramentas capazes de investigar perfis sorológicos atípicos, além de fornecer informações sobre a eficácia do tratamento antiviral. Portanto, o teste de PCR para o HBV-DNA qualitativo (ou quantitativo) pode ser aplicado na avaliação da infecção pelo HBV, como por exemplo, no diagnóstico de hepatite fulminante, no monitoramento da resposta ao tratamento, no diagnóstico da infecção em pacientes HBsAg negativos (hepatite B oculta) e em pacientes que apresentam o vírus mutante. É recomendado que um resultado positivo de PCR seja também avaliado junto ao contexto clínico e aos outros achados laboratoriais do paciente (14).

Com um controle rígido da contaminação, métodos eficientes de extração da amostra, protocolos otimizados e com a implantação de controles de qualidade internos e externos, a PCR “in house” tem se tornado um teste laboratorial confiável. E o limite de detecção de 500 cópias/mL encontrada em nossa técnica está dentro da faixa relatada por outros estudos de sensibilidade de métodos moleculares (22).

REFERÊNCIAS

- Horvat RT, Tegtemeier GE. Hepatitis B and D Viruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (editors). *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. Washington DC: ASM Press, v.2, 2007, p.1641-59.
- Hoofnagle JH. Chronic Hepatitis B Epidemiology. *N Engl J Med* 1990; 323:337-39.
- Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B virus Infection. *J Med Sci* 2004;2:50-57.
- WHO [homepage na Internet]. World Health Organization; acesso em 2005, abr 08. Disponível em: <http://www.who.int>.
- Programa Nacional de DST e Aids [homepage na internet]. Ministério da Saúde; acesso em 2005, abr 08. Disponível em: http://www.aids.gov.br/assistencia/manual_dst/hepatite.htm
- Fagan, EA, and T.J. Harrison. Hepatitis B (HBV) and Hepatitis D (HDV, delta) viruses. In: EA Fagan and TJ Harrison (ed.), *Viral Hepatitis*. Springer-Verlag, Inc., New York 2000; p.89-130.
- Alquezar AS, Bassit L, Sabino EC. Hepatites virais. In: Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2^oed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001; p.74-91.
- Valliammai T, Thyagarajan SP, Zuckerman AJ, Harrison TJ. Precore and core mutations in HBV from individuals in India with chronic infection. *J Med Virol* 1995; 45: 321-25.
- Wakita T, Kakumu S, Shibata M, Yoshioka K, Ito Y, Shinagawa T et al. Detection of pre-core and core mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Invest* 1991; 88:1793-801.
- Mahoney FJ. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(2):351-66.
- Chuang WL, Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Ito Y, Imazeki F et al. Precore mutations and core clustering mutations in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterol* 1993;104:263-71.
- Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34: 617-24.
- Rezende REF, Fonseca BAL, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Pinho JRR, Bertolini DA, Martinelli ALC. The precore mutation associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2005;32:53-9.
- Marinho C, Agostinho C. SIDANET - Associação Lusófona [homepage na Internet] Lisboa: SIDANET; acesso em 2005, ago 15. Disponível em: http://www.aidsportugal.com/hepatites/46_91.pdf.
- Pawlotsky JM, Bastie AB, Lonjon I, Remire J, Darthuy F, Soussy CJ, Dhumeaux D. What technique should be used

- for routine detection and quantification of HBV DNA in clinical samples. *J Virol Meth* 1997;65:245-53.
16. Fattovich G, Rugge M, Brollo L, Pontiosso P, Noventa F, Guido M, Alberti A, Realdi G. 1986. Clinical virological and histologic outcome following seroconversion from HBcAg to anti-HBe in chronic hepatitis type b. *Hepatology* 1986;6:162-72.
 17. Sablon E, Shapiro F. Review: Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *Int J Med Sci* 2005;2(1):8-16.
 18. Gonçalves Jr, FL, Pereira JSF, Silva C, Thomaz GR, Pavan MHP, Fais VC et al. Hepatitis B virus in sera of blood donors and of patients infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clin Diag Lab Immunol* 2003;10:718-20.
 19. Valentine-Thon E. Evaluation of Sharp signal system for enzymatic detection of amplified hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 1995;2:477-80.
 20. Chen RW, Piiparinen H, Seppanen M, Koskela P, Sarna S, Lappalainen M. Real time for detection and quantitation of hepatitis B virus DNA. *J Med Virol* 2001;65(2):250-6.
 21. Peng XM, Gu L, Chen XJ, Li JG, Huang YS, Gao ZL. Optimization of competitively differentiated polymerase chain reaction in detection of HBV basal core promoter mutation. *Gastroenterol* 2005;11(23):3614-8.
 22. Valentine-Thon E, van Loon AM, Schirm J, Reid J, Klapper PE et al.. European proficiency testing program for molecular detection and quantitation of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 2001;39(12):4407-12.