

QUADROS ATÍPICOS DE MARCADORES DA HEPATITE B E VACINAÇÃO

JOSÉ VELOSA

Unidade de Hepatologia, Serviço de Medicina II. Hospital de Santa Maria. Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa.

RESUMO

Descrevem-se vários padrões serológicos atípicos da infecção pelo vírus da hepatite B, os quais podem originar dificuldades no diagnóstico e na classificação do estágio da doença. O seu conhecimento é indispensável para o estabelecimento duma correcta estratégia de rastreio dos dadores de sangue e dos candidatos à vacinação. O resultado desta pode, por vezes, ser útil na interpretação do quadro serológico. Discute-se também o papel dos mutantes do vírus neste contexto.

SUMMARY

Atypical profiles of hepatitis B virus markers and vaccination

We describe several atypical serological profiles of hepatitis B virus infection (HBV), which can arise difficulties in diagnostic and classification of the infection stage. Its knowledge is important in establishing a more accurate strategy of the screening of blood donors and candidates for vaccination. On the other hand, vaccination may be useful in interpretation of the serological profile. We also discuss the role of HBV mutants in this context.

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite B (VHB) é um vírus ADN compacto com quatro regiões de leitura (*open reading frames*), algumas parcialmente sobrepostas, o que lhe confere a capacidade única de produzir diversas proteínas com uma extensão 1,5 vezes superior à do seu genoma¹. Por outro lado, possui nos genes S e C mais do que um códon de início da transcrição dando, assim, origem a uma multiplicidade de antígenos e respectivos anticorpos (*Quadro 1*). Em termos práticos podemos definir dois padrões serológicos típicos: AgHBs e anti-HBc que corresponde à hepatite aguda (anti-HBc predominantemente da classe IgM) e à hepatite crónica; e outro anti-HBc e anti-HBs que significa imunidade adquirida. A determinação do sistema antígeno-anticorpo e, um bom indicador da replicação vírica, tem pouco valor no diagnóstico serológico.

Neste trabalho procuramos descrever e interpretar alguns padrões serológicos *anormais*, numa perspectiva eminentemente clínica e daí retirar algumas indicações para a vacinação. Analisaremos ainda a persistência da replicação vírica em doentes com marcadores serológicos que não a faziam supôr estar presente.

AgHBs isolado

A presença do AgHBs na ausência de qualquer outro marcador pode ter diversas interpretações. O AgHBs é o primeiro marcador a aparecer no soro dos indivíduos infectados com o VHB, pelo que na fase precoce da infecção, quando não surgiram ainda os sintomas e sinais sugestivos de hepatite aguda, o AgHBs pode ser o único marcador em circulação^{2,3}.

A ausência persistente do anti-HBc em portadores crónicos do VHB é um fenómeno raro, que tem sido descrito principalmente em crianças asiáticas nascidas de mães portadoras do VHB⁴. Estes autores demonstraram que a ausência de anti-HBc não se deve à existência dum mutante, mas sim à incapacidade do sistema imune do portador para produzir aquele anticorpo^{5,6}. Contudo, a possibilidade dum mutante incapaz de produzir anti-HBc ser o responsável por esta situação, não está completamente excluída como sugerem Bhat et al⁷. O doente descrito por estes autores tinha a particularidade de estar infectado com o vírus da imunodeficiência humana, era AgHBe e ADN-VHB positivo e a sequenciação dos genes do pré-*core* e *core* revelou diversas mutações.

Quadro 1 – Marcadores do vírus da hepatite B

Antigénio	Anticorpo
AgHBs	Anti-HBs
AgHBe	Anti-HBe
AgHBc	Anti-HBc (IgG, IgM)
Ag PréS1	Anti-PréS1
AgPréS2	Anti-PréS2
AgHBx	Anti-HBx
pHSA	Anti-pHSA

ADN polimerase
ADN do VHB

Quadro 2 – Significado do anti-HBc isolado

Falso-positivo
Convalescença de hepatite aguda (*período de janela*)
Perda do anti-HBs
Portadore com antigenémia s baixa
Mutante do AgHBs
Marcador paralelo da hepatite C

Anti-HBc isolado

A frequência de anti-HBc isolado é variável consoante a região do globo, o estrato profissional e o grupo etário. Varia entre 0,5 e 4 % nos Estados Unidos da América⁸⁻¹⁰, 20% no Senegal¹¹, 13% na China¹² e 3% no Alaska¹³. Em Portugal é de 2,5% em profissionais de saúde (R Marinho, dados não publicados) e de 15% em alcoólicos com doença hepática crónica¹⁴. As possíveis explicações para este padrão atípico constam do *Quadro 2*. O *período de janela*, ou seja, a fase de convalescença da hepatite aguda em que o AgHBs já desapareceu e o anti-HBs ainda não é detectável no soro, pode ocorrer em 11% dos casos¹⁵. Por ventura a maneira mais simples de avaliar o significado do anti-HBc isolado será estudar a resposta à vacina contra o VHB^{13,16-18}. Lok et al¹⁸ estudaram 214 indivíduos com anti-HBc isolado, tendo verificado que a repetição do teste no mesmo soro e uma nova determinação 3 meses depois, reduzia para 60 (30%) o número de indivíduos nesta condição. Destes, 32 foram vacinados verificando-se uma resposta secundária (anamnésica) em 5 (16%), primária em 14 (56%) e ausência de resposta em 13 (28%). No Alaska, McMahon et al¹³ observaram uma resposta secundária mais reduzida (8%) e uma resposta primária mais elevada (79%). Outros estudos, embora com amostras mais reduzidas, encontraram uma resposta primária entre 85% e 90% e uma resposta secundária entre 7% e 10%^{16,17}. As ilações a extrair destes estudos são as seguintes: em primeiro lugar, o anti-HBc isolado é, na larga maioria dos casos, um resultado falso-positivo, tanto mais frequente quanto o método de ELISA¹³ for o teste utilizado para a determinação do anticorpo; em segundo, sensivelmente 10 % desses portadores estão imunizados contra o VHB e respondem a uma dose de vacina com uma subida significativa do títu-

lo de anti-HBs; por último, uma fracção de indivíduos, que varia entre os 8% e os 28% não respondem à vacinação, sugerindo que se trata de portadores do AgHBs com baixa antigenémia¹⁹. A importância do conhecimento destes dados é por de mais evidente quando se tem em vista definir e implementar estratégias de rastreio da infecção por VHB, destinadas à selecção dos candidatos à vacinação e dos dadores de sangue. Relativamente aos últimos já era conhecido que o sangue de dadores com anti-HBc isolado era susceptível de transmitir a hepatite B²⁰, o que traz para a ordem do dia a necessidade de se testar este marcador nos bancos de sangue, tanto mais que recentemente foi demonstrada a presença do ADN do VHB numa percentagem significativa destes soros²¹⁻²³. A *Figura 1* representa o organigrama de actuação perante um caso de anti-HBc isolado.

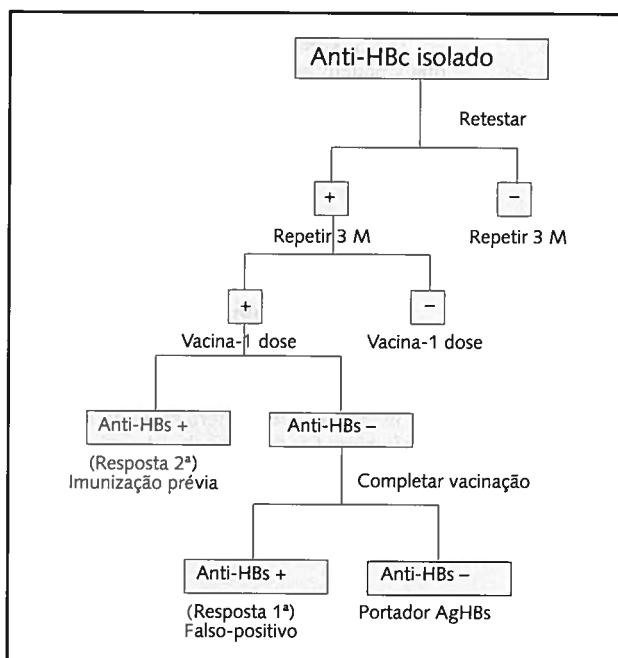


Fig. 1 – Investigação e interpretação dos resultados num caso de anti-HBc isolado.

Anti-HBs isolado

O anti-HBs é o anticorpo neutralizante do VHB, cujo aparecimento traduz a cura da infecção². A presença deste marcador na ausência do anti-HBc é uma situação rara, variando entre os 4% e os 12%^{9,10,14,24,25}. É possível que esta prevalência esteja sobrestimada em virtude dos estudos terem incidido principalmente em profissionais de saúde, nos quais o contacto constante com sangue ou produtos sanguíneos eventualmente infectados com o VHB poderia ser responsável por este fenómeno¹⁰. No nosso estudo²⁵ este padrão estava associado aos indivíduos mais jovens e com menos anos de serviço. Outras explicações para a presença do anti-HBs isolado constam do *Quadro 3*.

À semelhança do que acontece com o anti-HBc, também o anti-HBs isolado é frequentemente um falso-positivo

Quadro 3 – Significado do anti-HBs isolado

Falso-positivo (IgM)
Imunidade para o VHB (vacinação)
Perda do anti-HBc
Imunização espontânea para o VHB

vo, muitas vezes uma imunoglobulina da classe IgM, igualmente presente noutras espécies animais como reacção a antigénios não víricos^{24,26}. A reprodutibilidade do teste está directamente relacionada com o título do anticorpo, mas mais uma vez a resposta à vacina pode ser esclarecedora quanto à verdadeira situação serológica do portador do anti-HBs. Werner et al²⁶, com este propósito, avaliaram 46 indivíduos e verificaram que apenas 10 (22%) respondiam com títulos de anti-HBs sugestivos de resposta anamnésica, estando esta directamente relacionada com o título mais elevado de anti-HBs obtido antes da administração da vacina. Na prática, esta situação pode ser manejada de acordo com o esquema da *Figura 2*.

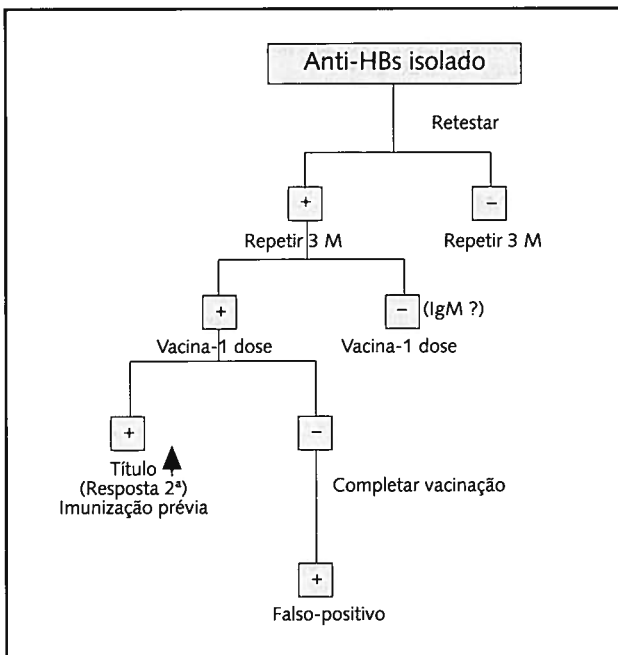


Fig. 2 – Investigação e interpretação dos resultados num caso de anti-HBs isolado

Do exposto, facilmente se infere as dificuldades no estabelecimento duma estratégia de rastreio pré-vacinação que tenha como base apenas um marcador. A opção por qualquer dos marcadores (anti-HBc ou anti-HBs) isoladamente, se bem que mais económica, não permite avaliar correctamente a susceptibilidade dum indivíduo face ao VHB. Portanto, quando o rastreio destinado a seleccionar os candidatos à vacinação for necessário, o que nos países ocidentais é discutível, a opção mais segura deverá ser a pesquisa conjunta do anti-HBc e anti-HBs.

AgHBs e anti-HBs positivos

A detecção simultânea do AgHBs e do respectivo anticorpo neutralizante pode ser observada na hepatite aguda²⁷, na hepatite crónica²⁸⁻³⁰ e no carcinoma hepatocelular³¹. Se o AgHBs for pesquisado por um método usando anticorpo monoclonal, que permite a detecção do antígeno presente em imunocomplexos, então a positividade pode ser mais elevada³².

A justificação para esta aberração serológica pode ser diversa. A mais frequente parece ser a infecção com subtipos diferentes do VHB em que o AgHBs é normalmente do subtipo ad e o anticorpo do subtipo anti-y²⁸⁻³⁰. Outra possibilidade é a infecção por um variante do VHB dum indivíduo previamente imunizado para o VHB, portanto, com anti-HBs. Esta situação foi, por exemplo, descrita por Coursaget et al³³, em naturais do Senegal, nos quais a imunidade para o VHB não protegia da infecção por um vírus variante, incapaz de produzir anti-HBc, a qual tinha a capacidade de evoluir para o estado de portador crónico.

Por último, este padrão pode surgir no contexto da vacinação. Foi inicialmente relatado por Carman et al³⁴ em crianças italianas, filhas de mães portadoras, eficazmente vacinadas contra o VHB, que se infectaram com o vírus materno por este ter sofrido uma mutação no gene S que escapava à vigilância imune da criança. A mutação ocorria no determinante α da proteína HBs, no aa 145, onde a glicina foi substituída pela arginina. Um mecanismo semelhante foi observado em doentes com hepatite B submetidos a terapêutica com anticorpo monoclonal após terem recebido um transplante hepático³⁵. Sob a pressão imune provocada pela administração de doses elevadas de anticorpo monoclonal contra o AgHBs a mesma mutação ocorreu.

Portadores AgHBs e anti-HBe com transaminases elevadas

Como é sabido, a maioria dos portadores crónicos do AgHBs são anti-HBe e têm transaminases normais³⁶. Por outro lado, a seroconversão para anti-HBe, um dos aspectos mais marcantes da história natural da hepatite B crónica, leva invariavelmente à normalização das transaminases³⁷. De modo que a manutenção da actividade inflamatória nos doentes anti-HBe pode considerar-se uma situação anormal.

Presentemente sabe-se que a seroconversão não corresponde à eliminação da replicação vírica, mas a uma redução drástica nos níveis circulantes de ADN do VHB³⁸⁻⁴⁰, e à substituição do vírus nativo por uma população vírica onde predomina o mutante pré-core^{41,42}. Embora a eclosão do mutante pré-core, como população vírica dominante, coincida por norma com a seroconversão para anti-HBe, qualquer que seja o comportamento bioquímico posterior, não estão ainda elucidadas as razões porque alguns doentes continuam com hepatite crónica e outros se transformam em portadores saudáveis. Provavelmente, essa evolução depende da concorrência de mutações no gene do core⁴³. Alguns autores⁴⁴ sugerem que estes doentes, incapazes de produzir o AgHBe, embora mantenham a replicação vírica, têm uma forma de doença

hepática mais agressiva e se apresentam em estádios clínicos mais avançados.

Replicação vírica em doentes anti-HBs e anti-HBc positivos

A existência de replicação do VHB em doentes nos quais não se identificam marcadores do VHB ou com marcadores de imunidade para o vírus é relativamente frequente na doença hepática crónica, quando o ADN do VHB é pesquisado pela técnica da PCR⁴⁵. Este quadro serológico tem sido descrito em doentes com hepatite crónica^{46,47} e com carcinoma hepatocelular⁴⁸⁻⁵⁰. Pelo contrário, nos doentes que recuperaram duma hepatite aguda não foi possível detectar sequências víricas em circulação⁵¹. A demonstração que a seroconversão para anti-HBs após um longo período de infecção pode não eliminar completamente a replicação vírica, tinha já sido feita por Baker et al⁵², mas investigadores japoneses⁵³ foram mais longe ao documentarem o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em três doentes (um com hepatite crónica e dois com cirrose), nos quais a replicação vírica persistiu vários anos após o desaparecimento do AgHBs. Por fim, a evidência de que a replicação pode subsistir, sob a forma activa ou latente, em doentes com anti-HBs e anti-HBc, foi demonstrada pela reactivação do vírus em indivíduos sujeitos a terapêutica imunossupressora⁵⁴.

Novamente se põe a questão de saber se o sangue de dadores com marcadores reveladores de imunidade deverá ser aproveitado. Pensamos que não, principalmente se houver suspeita de doença hepática crónica ou história de hepatite B crónica no passado. Os raros casos de hepatite B pós-transfusional que ainda ocorrem, apesar do sangue doado ter sido previamente testado, têm origem precisamente em amostras que revelam a presença de anti-HBs e anti-HBc^{55,56} ou anti-HBc isolado, quando o rastreio dos dadores apenas inclui o AgHBs.

CONCLUSÕES

Os marcadores serológicos do VHB correntemente utilizados permitem uma adequada discriminação entre a infecção aguda, crónica e pregressa. Por vezes, o padrão serológico encontrado não se adapta a um quadro clínico definido, o que acontece quando surge um marcador isoladamente ou uma associação ilógica de marcadores. A relevância vai para o aparecimento isolado do anti-HBc ou do anti-HBs, cujo conhecimento é de primordial importância no estabelecimento das estratégias de rastreio dos dadores de sangue e dos candidatos à vacinação contra o VHB. Embora sejam quase sempre resultados falsos-positivos, a sua presença mantida não dispensa a vacinação. A simultaneidade do AgHBs e anti-HBs tanto pode significar infecção com subtipos diferentes como apontar para a infecção com um vírus mutante num indivíduo previamente imunizado.

A persistência da replicação vírica em portadores anti-HBe positivos pode considerar-se inadequada ao padrão serológico do doente e resulta quase sempre da infecção

por um mutante pré-core do VHB. A detecção de sequências víricas em doentes sem marcadores séricos ou com marcadores sugestivos de imunidade, embora sem implicações na estratégia da imunoprofilaxia, alarga a compreensão da patogénese da doença hepática associada ao VHB.

BIBLIOGRAFIA

- MILLER RH, KANEKO S, CHUNG CT, GIRONES R, PURCELL R: Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1989; 9: 322-27
- KRUGMAN S, OVERBY LR, MUSHAWAR IK, LING CM, FROSNER GG, DEINHARDT F: Viral hepatitis type B. Studies on natural history and prevention re-examined. *N Engl J Med* 1979; 300: 101-06
- OVERBY LR, LING CM, DECKER RH, et al: Serodiagnostic profiles of viral hepatitis. In: Szmuness W, ed. *Viral hepatitis*. Philadelphia: Franklin Institute Press 1982: 169-82
- LEE SD, LO KJ, TSAI YT, WU JC, WU TC: HBsAg carrier infants with serum anti-HBc negativity. *Hepatology* 1989; 9: 102-04
- LEE JH, PAGLIERONI TG, HOLLAND PV, ZELDIS JB: Chronic hepatitis B virus infection in an anti-HBc-nonreactive blood donor: variant virus or defective immune response? *Hepatology* 1992; 16: 24-30
- LAZIZI Y, DUBREUIL P, PILLOT J: Excess HBcAg in HBc antibody-negative chronic hepatitis B virus carriers. *Hepatology* 1993; 17: 966-70
- BHAT RA, ULRICH PP, VYAS GN: Molecular characterization of a new variant of hepatitis B virus in a persistently infected homosexual man. *Hepatology* 1990; 11: 271-76
- HADLER SC, MURPHY BL, SCHABLE CA, HEYWARD WL, FRANCIS DP, KANE MA: Epidemiological analysis of the significance of low positive test results for antibody to hepatitis B surface and core antigens. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 521-25
- GRADY GF: Hepatitis B immunity in hospital staff. Targeted for vaccination. *JAMA* 1982; 248: 2266-69
- DIENSTAG JL, RYAN DM: Occupational exposure to hepatitis B virus in hospital personnel: infection or immunization? *Am J Epidemiol* 1982; 115: 26-39
- FERET E, LARAUZE B, DIOP B, SOW M, LONDON WT, BLUMBERG BS: Epidemiology of hepatitis B virus infection in the rural community of Tip, Senegal. *Am J Epidemiol* 1987; 125: 140-49
- HU M, SCHENZLE D, DEINHARDT F, SCHEID R: Epidemiology of hepatitis A and B in the Shanghai area: prevalence of serum markers. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 404-13
- MCMAHON BJ, PRKINSON AJ, HELMINIAK C, et al: Response to hepatitis B vaccine of persons positive for antibody to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 1992; 103: 590-94
- CARVALHO A, PORTO A, COIMBRA HB, GARÇÃO F: A doença hepática crónica dos alcoólicos e o vírus da hepatite B. *Revista de Gastroenterologia* 1987; 5: 108-15
- TASSOPOLOS NC, PAPAANGELOU GJ, SJOGREN MH, ROUMELIOTOU-KARAYANNIS A, GERIN JL, PURCELL RH: Natural history of acute hepatitis B surface antigen-positive hepatitis in greek adults. *Gastroenterology* 1987; 92: 1844-50
- GONDEAU A, DUBOIS F: Immune studies of anti-HBc positive individuals (letter). *Lancet* 1984; 8: 102-07
- DRAELOS M, MORGAN T, SCHIFMAN RB, SAMPLINER RE: Significance of isolated antibody to hepatitis B core antigen determined by immune response to hepatitis B vaccination. *JAMA* 1987; 258: 1193-95
- LOK ASF, LAI CL, WU PC: Prevalence of isolated antibody to hepatitis B core antigen in an area endemic for hepatitis B virus infection: implications in hepatitis B vaccination programs. *Hepatology* 1988; 8: 766-70
- SUGG U, ERHARDT S, SCHNEIDER W: Chronic low level hepatitis B virus carrier with probable infectivity. *Lancet* 1982; 1: 446-47
- HOOFNAGLE JH, SEEFF LB, BALES ZB, ZIMMERMAN HJ, and Veterans Administration Hepatitis Cooperative Study Group. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med* 1978; 298: 1379-83
- JILG W, SIEGER E, ZACHOVAL R, SCHATZL H: Individuals with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker for hepatitis B infection: high percentage of carriers of hepatitis B and C virus. *J Hepatol* 1995; 23: 14-20

22. SANCHEZ-QUIJANO A, JAUREGUI JL, LEAL M et al: Hepatitis B virus occult infection in subjects with persistent isolated anti-HBc reactivity. *J Hepatol* 1993; 17:288-93.
23. SCULLY LJ, SUNG H, PENNIE R, GILL P: Detection of hepatitis B virus DNA in the serum of canadian hepatitis B surface antigen negative, anti-HBc positive individuals, using the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1994; 44: 293-97
24. KESSLER HA, HARRIS AA, PAYNE JA, HUDSON E, POTKIN B, LEVIN S: Antibodies to hepatitis B surface antigen as the sole hepatitis B marker in hospital personnel. *Ann Intern Med* 1985; 103: 21-26
25. VELOSA J, MARINHO R, RAMALHO F, CARNEIRO DE MOURA M: Inmunidad para el virus de la hepatitis B en personal hospitalario. Indicaciones para vacunación. *Gastroenterol y Hepatol* 1988; 11: 395-99
26. WERNER BG, DIENSTAG JL, KUTER BJ et al: Isolated antibody to hepatitis B surface antigen and response to hepatitis B vaccination. *Ann Intern Med* 1985; 103: 201-05
27. TRÉPO CG, ROBERT D, MOTIN J, TRÉPO D, SEPETJIAN M, PRINCE AM: Hepatitis B antigen (AgHBs) and/ or antibodies (anti-HBs and anti-HBc) in fulminant hepatitis: pathogenic and prognostic significance. *Gut* 1976; 17: 10-13
28. FOUTCH PG, CAREY WD, TABOR E et al: Concomitant hepatitis B surface antigen and antibody in thirteen patients. *Ann Intern Med* 1983; 99: 460-63
29. TSANG TK, BLEI AT, O'REILLY DJ, DECKER R: Clinical significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody positivity. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 620-24
30. SHIELS MT, TASWELL HF, CZAJA AJ, NELSON C, SWENKE P: Frequency and significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody in acute and chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1987; 93: 675-80
31. SJOGREN MH, LEMON SM, CHUNG WK, SUN HS, HOOFNAGLE JH: IgM antibody to hepatitis B core antigen in korean patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1984; 4: 615-18
32. WANDS JR, MARCINIAK RA, ISSELBACHER KJ et al: Demonstration of previously undetected hepatitis B viral determinants in an Australian aboriginal population by monoclonal anti-HBs antibody radioimmunoassays. *Lancet* 1982; 977-80
33. COURSAGET P, YVONNET B, BOURDIL C et al: HBsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus. *Lancet* 1987; 2:1354-58
34. CARMAN WF, ZANETTI AR, KARAYANNIS P et al: Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-29
35. MCMAHON G, EHRLICH PH, MOUSTAFA ZA et al: Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological assay of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant patients. *Hepatology* 1992; 15: 757-66
36. RAMALHO F, VELOSA J, BAPTISTA A, CARNEIRO DE MOURA M: Portadores assintomáticos do antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs). Um estudo clínico, serológico e anatomo-patológico. *J Médico* 1984; 115: 2-15
37. FATTOVICH G, RUGGE M, BROLLO L et al: Clinical, virologic and histologic outcome following seroconversion from HBeAg to anti-HBe in chronic hepatitis type B. *Hepatology* 1986; 6: 167-72
38. SHIH LN, SHEU JC, WANG JT et al: Detection of hepatitis B viral DNA by polymerase chain reaction in patients with hepatitis B surface antigen. *J Med Virol* 1990; 30: 159-62
39. KORENMAN J, BAKER B, WAGGONER J, EVERHART JE, DI BISCEGLIE AM, HOOFNAGLE JH: Long-term remission of chronic hepatitis B after alpha-interferon therapy. *Ann Intern Med* 1991; 114: 629-34
40. LORIOT MA, MARCELLIN P, BISMUTH E et al: Demonstration of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in the serum and liver after spontaneous or therapeutically induced HBeAg to anti-HBe or HBsAg to anti-HBs seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1992; 15: 32-36
41. BRUNETTO MR, GIARIN MM, OLIVERI F et al: Wild-type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4186-90
42. LAI ME, SOLINAS A, MAZZOLENI AP et al: The role of pre-core hepatitis B virus mutants on the long-term outcome of chronic hepatitis B virus hepatitis. A longitudinal study. *J Hepatol* 1994; 20: 773-81
43. CHUANG WL, OMATA M, EHATA T et al: Precore mutations and core clustering mutations in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1993; 104: 263-71
44. NAUMOV NV, SCHNEIDER R, GROTZINGER T et al: Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology* 1992; 102: 538-43
45. FAGAN EA, DAVISON FD, TROWBRIDGE R et al: Detection of hepatitis B virus DNA sequences in liver in HBsAg seronegative patients with liver diseases with and without anti-HBc antibodies *Q J Med* 1991; 286: 123-34
46. FIGUS A, BLUM HE, VYAS GN et al: Hepatitis B viral nucleotide sequences in non-A, non-B or hepatitis B virus-related chronic liver disease. *Hepatology* 1984; 4: 364-68
47. KANEKO S, MILLER R, FEINSTONE S et al: Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 312-16
48. BRÉCHOT C, HADCHOUEL M, SCOTTO J et al: State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and negative liver diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3906-10
49. NALPAS B, BERTHELOT P, THIERS V et al: Hepatitis B virus multiplication in the absence of usual serological markers. A study of 146 chronic alcoholics. *J Hepatol* 1985; 1: 89-97
50. PATERLINI P, GERKEN G, NAKAJIMA E et al: Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patients negative for hepatitis surface antigen. *N Engl J Med* 1990; 323: 80-85
51. KANEKO S, MILLER R, DI BISCEGLIE A, FEINSTONE S, HOOFNAGLE J, PURCELL R: Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 1990; 99: 799-04
52. BAKER BL, DI BISCEGLIE AM, KANEKO S et al: Determination of hepatitis B virus DNA in serum using the polymerase chain reaction: clinical significance and correlation with serological and biochemical markers. *Hepatology* 1991; 13: 632-36
53. ADACHI H, KANEKO S, MATSUSHITA E, INAGAKI Y, UNOURA M, KOBAYASHI K: Clearance of HBsAg in seven patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1992; 16: 1334-37
54. LOK ASF, LIANG RH, CHIU EKW, WONG KL, CHAN TK, TODD D: Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. *Gastroenterology* 1991; 100: 182-88.
55. THIERS V, NAKAJIMA E, KREMSDORF D et al: Transmission of hepatitis B from hepatitis-B-seronegative subjects. *Lancet* 1988; 2: 1273-76
56. WANG JT, WANG TH, SHEU JC, SHIH LN, LIN JT, CHEN DS: Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1991; 163: 397-99