

UTILITAT DE LA DETERMINACIÓ DEL DNA DEL VIRUS DE L'HEPATITIS B EN SÈRUM PER HIBRIDACIÓ MOLECULAR

J. COSTA, I. GIBERT, J. BARBÉ, V. GARCIA BERNABÉ, J.M. SÁNCHEZ TAPIAS, i J. RODÉS

*Unitat d'Hepatologia. Hospital Clínic i Provincial. Universitat de Barcelona.
Departament de Genètica i Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona.*

RESUMEN

Mediante una técnica de hibridación molecular, utilizando como sonda DNA-VHB purificado de un plásmido recombinante, se ha examinado la presencia de DNA-VHB en el suero de 82 portadores crónicos de HBsAg (RIA) sin evidencias de infección delta y en 80 sujetos HBsAg negativos (40 donantes de sangre y 40 con hepatitis crónica o cirrosis no alcohólica). Se detectó DNA-VHB en cantidades variables en los 62 portadores crónicos (57 HBeAg positivo y 5 antiHBe positivo) con transaminasas elevadas, lesiones de hepatitis crónica y presencia de HBcAg en el tejido hepático (inmunoperoxidasa). En los 8 portadores con transaminasas elevadas, antiHBe positivo, lesiones de hepatitis crónica y HBcAg ausente del hígado, se detectó DNA-VHB sérico en forma intermitente. El examen fue negativo en los 11 portadores crónicos con antiHBe positivo y transaminasas normales, así como en los sujetos HBsAg negativo.

La presencia de DNA-VHB en el suero se asocia a la existencia de actividad inflamatoria y refleja la actividad replicativa del VHB con mayor fidelidad que la valoración del sistema antigénico HBe. Su examen constituye un elemento sumamente útil tanto para el estudio de la historia natural de la infección crónica por el VHB como para la valoración de agentes terapéuticos.

INTRODUCCIÓ

El virus de l'hepatitis B (VHB) és una partícula infecciosa de 42 nm de diàmetre (Fig. 1). Presenta una coberta lipoproteica on es localitza l'antigen de superfície (HBsAg). Aquesta coberta conté un nucli proteic on s'expressa l'antigen del "core" (HBcAg) i l'antigen "e" (HBeAg) que és probablement una forma críptica de l'ante-

rior. Associat al nucli es troba una doble cadena de DNA circular (DNA-VHB) i un enzim amb activitat DNA polimerasa (DNAP).

La infecció per aquest virus patogen és al nostre país una causa important de morbiditat i de mortalitat i ocasiona, a part de l'estat de portador sa, una àmplia varietat de processos patològics que inclouen l'hepatitis aguda, les diferents formes d'hepa-

titis crònica, la cirrosi i el càncer primitiu de fetge.

A la infecció crònica pel VHB els fenòmens d'inflamació i de necrosi hepàtica s'associen normalment a la presència de replicació vírica activa i, al contrari, la seva absència correspon a una fase posterior d'inactivació de la malaltia. De no produir-se aquest canvi qualitatiu en el decurs de l'evolució de l'hepatitis crònica, és a dir, de persistir la replicació del virus, la probabilitat que la malaltia progressi a formes irreversibles de lesió del tipus de la cirrosi hepàtica és molt més elevada que en el cas contrari (9, 19). D'ençà que hom disposa de medicaments antivírics, es realitzen estudis terapèutics amb el propòsit de provocar l'erradicació de l'activitat replicativa del virus disminuint així el risc de la possible progressió de la malaltia (17, 26).

Tant per a la selecció dels malalts a tractar (és obvi que cal triar només aquells qui presenten replicació vírica) com per al control de l'acció antivírica de la droga utilitzada, és imprescindible disposar de tècniques no invasives que permetin d'avaluar de forma seriada l'estat replicatiu del VHB en un malalt concret.

D'altra banda, el grau de replicació del VHB és un indicador del potencial d'un pacient de transmetre la infecció i per tant el seu coneixement permet de prendre les mesures necessàries per evitar el contagi de les persones del seu entorn més immediat.

En resum, el coneixement de l'estat replicatiu del VHB en un pacient concret és de gran interès clínic ja que indica actituds profilàctiques i terapèutiques diferents.

Per determinar l'activitat replicativa del VHB hi ha diversos procediments. Cal aclarir que la detecció d'HBsAg en sèrum no dona una informació adequada al respecte ja que normalment a la infecció crònica pel VHB el DNA víric s'integra en el genoma de l'hepatòcit expressant-se la

seqüència que codifica l'HBsAg. La proteïna vírica és sintetitzada per la cèl·lula i posteriorment alliberada a la sang. Per tant, aquest antigen es trobarà en sèrum tant si el virus es replica activament com si no. Així doncs, cal explorar la presència de components de la nucleocàpsida en sèrum o en teixit hepàtic per avaluar l'existència de replicació vírica. Fins fa poc temps els marcadors de replicació més utilitzats han estat l'HBsAg (24), l'HBcAg (18) o la DNAP (11) en sèrum i l'HBcAg en teixit hepàtic (29). Tots aquests mètodes presenten diverses limitacions que han fet palesa la necessitat d'emprar procediments més adequats. Aquests darrers anys, la clonació en bacteris del genoma del VHB ha fet possible l'obtenció de DNA víric específic (4), per a ser utilitzat com a sonda en estudis d'hibridació molecular per a la detecció de DNA-VHB en els teixits i fluids corporals.

El propòsit d'aquest estudi ha estat l'avaluació d'un mètode de determinació, en sèrum, del DNA-VHB per hibridació molecular com a índex de la replicació del VHB, tot comparant-lo amb altres marcadors més coneguts de l'activitat vírica.

MATERIAL I MÈTODES

Pacients i sèrums

S'ha estudiat el sèrum de 161 persones dividides en tres grups: el grup I estava format per 70 pacients amb hepatitis crònica i HBsAg positiu. En el grup II es van incloure 11 portadors sans de l'HBsAg, amb valors repetidament normals d'aminotransferases. El grup III era format per 80 persones HBsAg sero-negatives, 40 de les quals eren donadors de sang i les 40 restants presentaven lesions d'hepatitis crònica d'etiologia no alcohòlica. Cap dels pacients de l'estudi no presentava evidències de sobreinfecció per l'agent delta (VHD).

El diagnòstic d'hepatitis crònica es va realitzar segons criteris internacionals, mitjançant l'anàlisi histopatològica de biòpsies hepàtiques les quals foren practicades a malalts que mostraven elevació de transaminases durant més de sis mesos.

A totes les persones de l'estudi se'ls va recollir mostres de sèrum, les quals foren guardades a -20°C fins al moment de la seva anàlisi. L'extracció de les mostres de sèrum estudiades, corresponents a malalts amb hepatitis crònica, es va realitzar el mateix dia de la pràctica de la biòpsia hepàtica.

Soques bacterianes i plasmidi utilitzats

El plasmidi utilitzat ha estat el pBH20-VHB que és portador del DNA del virus de l'hepatitis B, insertat en la diana *Eco* RI del pBH20, el qual és un derivat del pBR322. Aquest plasmidi va ésser propagat en la soca HB101 d'*Escherichia coli*.

Mètodes serològics

En totes les mostres de sèrum es van investigar els següents marcadors del VHB: DNA-VHB, HBcAg, i HBsAg. A més, en els sèrums HBsAg positius, es va determinar HBeAg, antiHBe i antidelta.

La determinació de DNA-VHB s'ha realitzat segons el mètode d'hibridació "blot dot" descrit per SCOTTO i cols. l'any 1983 (22) (Fig. 2). Un volum de $5\ \mu\text{l}$ de sèrum, control o problema, ha estat incubat amb $25\ \mu\text{l}$ de NaCl 3M i amb $50\ \mu\text{l}$ de NaOH 1M, durant 10 minuts a temperatura ambient i adsorbit directament a nitrocel·lulosa per filtració. Immediatament s'ha afegit a cada mostra, $100\ \mu\text{l}$ de Tris-HCl pH 7.4 per a la neutralització. Després d'assecar els filtres a temperatures ambient, s'han incubat durant 2 hores a 80°C per a la fixació del DNA.

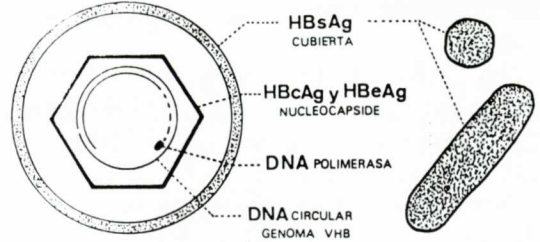


Fig. 1. Estructura del VHB. Aquest virus presenta un embolcall de naturalesa lipoproteica amb un antigen de superfície (HBsAg). La coberta engloba un nucli on es detecta l'antigen del "core" (HBcAg) i una forma críptica d'aquest denominada antigen "e" (HBeAg). Associat al nucli hi ha el genoma víric format per una doble cadena de DNA circular. Una de les dues cadenes es troba incompleta. El filament més llarg presenta una ruptura ("nick"). A més a l'extrem 3' del filament curt hi ha un enzim amb activitat DNA polimerasa (DNAP).

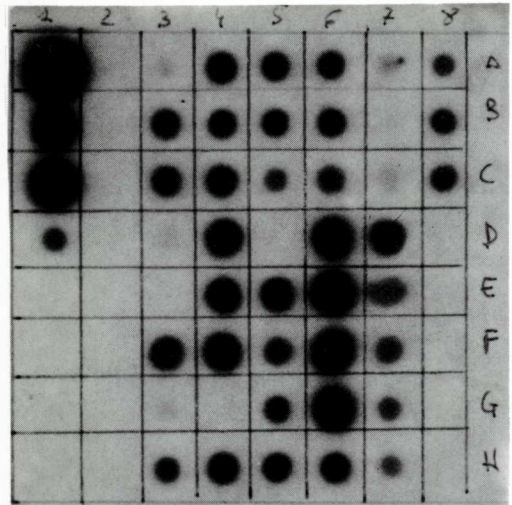


Fig. 2. Hibridació molecular "blot dot". Imatge obtinguda després de l'autoradiografia i del revelat. La columna número 2 correspon als controls negatius, i la resta de posicions als controls positius i a les diferents mostres de sèrum analitzades. Les taques negres assenyalen les mostres amb DNA-VHB. La seva intensitat és proporcional al grau de positivitat de les mostres.

Per a l'extracció del plasmidi quimèric s'ha seguit el mètode de BIRMBON modificat (1). L'aïllament del genoma del VHB

ha estat segons el mètode de l'electroelució (28).

La prehibridació s'ha realitzat a 65 °C tota una nit, amb una solució que contenia 5 × SSC, 10 × solució de Denhart, 10 × sulfat dextrà, 0,02M de fosfat di-bàsic i 0,3 mg/ml de DNA d'esperma de salmó. La hibridació es va portar a terme a 68 °C durant 16 hores amb una solució idèntica a l'anterior a la qual s'han afegit 200 µl de la sonda, marcada amb P³² per "nick translation" (20), l'activitat específica de la qual era de 1-4 × 10⁸ cpm/µg de DNA-VHB. Un cop finalitzada la hibridació s'han rentat els filtres durant 5 minuts a temperatura ambient amb 5 × SSC i 0,1 % de SDS i quatre vegades de 30 minuts a 55 °C amb 0,1 × SSC i 0,1 % de SDS. Per a l'autoradiografia s'ha utilitzat pel·lícula Kodak X-Omat S. La impressió de la placa fotogràfica ha estat reforçada amb mampares Dupont Cronex HI-Plus.

L'HBcAg ha estat determinat segons el mètode de NEURATH i cols. (16). S'han incubat 400 µl de sèrum amb nonidet P-40 per trencar la coberta del virus i alliberar l'HBcAg el qual formarà immunocomplexos amb l'antiHBc circulant. Els immunocomplexos resultants es precipiten amb polietilenglicol 6.000 al 2 % i després de tres rentats són incubats amb NaSCN 3M per dissociar els seus components. A continuació s'incuba durant tota la nit amb boles de poliestirè. L'antigen i l'anticòs s'adsorbeixen per separat damunt la superfície del plàstic. L'activitat HBcAg és detectada amb IgG antiHBc conjugada a ¹²⁵I. L'IgG antiHBc s'obté per cromatografia de bescanvi iònic amb Sepharosa 6B-CL-DEAE (Pharmacia) prèvia precipitació amb sulfat amònic. La font d'anticòs és sèrum d'un pacient que presenta un títol molt elevat d'antiHBc, però que no demostra activitat antiHBs, antiHBe ni antidel·ta. El marcatge de l'IgG amb ¹²⁵I s'ha fet segons el mètode de la cloramina T (10).

L'HBsAg, l'HBcAg, l'antiHBe i l'antidel·ta

s'han determinat per radioimmunoassaig (RIA) utilitzant reactius comercials (Abbott Labs. USA).

Mètodes immunohistològics

L'HBcAg i l'antigen delta han estat analitzats en mostres de teixit hepàtic, fixades en formol i incloses en parafina, segons mètodes d'immunoperoxidasa indirecta descrits per TREVISAN i cols. (27) amb petites modificacions (21).

RESULTATS

Dels 70 pacients amb hepatitis crònica pel VHB del grup I, 66 (94,3 %), 57 (81,4 %) i 51 (72 %) presentaven respectivament el DNA-VHB, l'HBcAg i l'HBsAg positiu en sèrum. A més, 62 (88 %) pacients d'aquest grup demostraven activitat HBcAg en teixit hepàtic.

No s'ha detectat DNA-VHB ni HBcAg al sèrum de cap dels 11 portadors sans del grup II (tots ells antiHBe positiu) ni tampoc al sèrum de les 80 persones del grup III.

Correlació entre DNA-VHB i HBcAg hepàtic

En el 93,9 % (62/66) dels pacients DNA-VHB positiu també es va detectar HBcAg en teixit hepàtic. A la inversa, tots els pacients amb HBcAg hístic presentaven DNA-VHB en sèrum. Això vol dir que no es va detectar HBcAg al fetge, malgrat la positivitat del DNA-VHB en sèrum, en 4/66 malalts (6,1 %).

Correlació entre DNA-VHB i HBcAg sèric

Els resultats de comparar la presència de DNA-VHB i de HBcAg en el sèrum dels

TAULA I

Correlació entre l'HBcAg sèric i la presència de DNA-VHB en el grup de malalts amb hepatitis crònica B

	DNA-VHB+ n = 66	DNA-VHB- n = 4
HBcAg + n = 51	51	0
HBcAg - n = 19	15	4

malalts del grup I, estan exposats a la Taula I. Dels 66 malalts DNA-VHB positiu, el 77,3 % (51/66) eren HBcAg positiu en sèrum i el 22,7 % (15/66) eren HBcAg negatiu.

Correlació entre DNA-VHB i sistema HBe/antiHBe

Dels pacients del grup I que van resultar positius pel DNA-VHB, el 86,36 % (57/66) tenien l'HBeAg positiu i el 13,63 % (9/66) tenien positiu l'antiHBe. A la inversa, tots els pacients HBeAg positiu i el 69 % dels antiHBe positiu del grup I, tenien DNA-VHB al sèrum.

D'acord amb els resultats de l'anàlisi del sistema HBeAg/antiHBe i del HBcAg en teixit hepàtic, es van dividir els 70 pacients del grup I en tres subgrups, el primer dels quals quedava format per 57 malalts amb HBeAg sèric i HBcAg hepàtic positiu. El segon subgrup estava constituït per 5 pacients antiHBe i HBcAg positius en sèrum i en biòpsia respectivament. Finalment, el tercer subgrup el formaven 8 pacients antiHBe positiu sense HBcAg al teixit hepàtic. Tots els malalts del primer i del segon subgrup (és a dir, tots els qui presentaven HBcAg en teixit hepàtic) eren DNA-VHB positiu en sèrum, així com també ho eren la meitat dels del tercer subgrup. Els quatre restants del tercer subgrup eren DNA-VHB i HBcAg negatius en sèrum (Fig. 3).

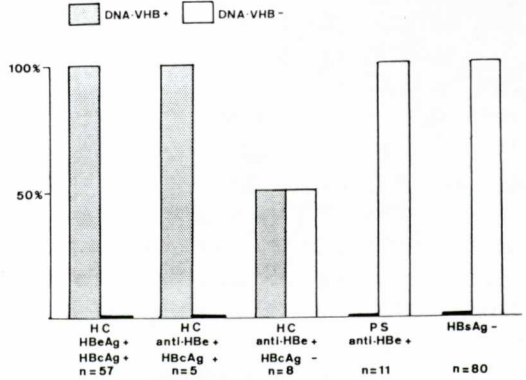


Fig. 3. Comparació entre el sistema HBeAg/antiHBe, l'HBcAg histic i la presència de DNA-VHB en sèrum. Tots els pacients amb hepatitis crònica B que tenien HBcAg al fetge, presentaven DNA-VHB al sèrum, tant si tenien l'HBeAg positiu com si tenien positiu l'antiHBe. Es va detectar DNA-VHB en la meitat dels malalts amb hepatitis crònica B que no tenien HBcAg al teixit hepàtic. D'altra banda, no es va detectar DNA víric en cap dels portadors sans de l'HBsAg ni en cap dels subjectes HBsAg negatiu.

DISCUSSIÓ

El percentatge de positivitat dels diferents marcadors de replicació comparats en aquest estudi demostra que la determinació de DNA-VHB és l'indicador més sensible de l'activitat replicativa del VHB.

Habitualment, la positivitat del HBeAg es correlaciona amb l'existència de replicació vírica, així com la seva absència s'associa a positivitat de l'antiHBe. L'anàlisi del sistema HBeAg/antiHBe és, donada la facilitat de la seva determinació, el procediment més utilitzat a la pràctica clínica diària per a la valoració de l'activitat replicativa del VHB. De totes maneres, algunes discrepàncies entre l'estat replicatiu del virus i el "status" HBe/antiHBe, fan d'aquest sistema un procediment poc recomanable per inexacte.

A l'estudi present, tots els sèrums HBeAg positiu que hem analitzat demostren positivitat del DNA-VHB. Altres treballs, però, no indiquen una correlació

tant estricta entre aquests dos marcadors, en el sentit que un percentatge que oscil·la entre el 9,2 % i el 19 % de sèrums HBeAg positius, són negatius pel DNA-VHB (12, 14, 25). La raó d'aquesta discrepància és que al contrari que en el nostre, els altres estudis inclouen sèrums HBeAg positius de pacients que es troben en una fase propera a la seroconversió espontània a anti-HBe, quant sovint el DNA-VHB ja s'ha negativitzat (6).

D'altra banda, la positivitat de l'anti-HBe a l'hepatitis crònica, no sempre assenyalava l'absència de replicació vírica, ja que 9 dels 13 pacients antiHBe del grup I eren DNA-VHB positiu. Això pot explicar el potencial de transmissió del VHB d'alguns pacients antiHBe sero-positius (23, 30). Donat que el nombre de malalts amb hepatitis crònica inclosos en aquest estudi és reduït, no podem extreure conclusions definitives de la freqüència de replicació del VHB en aquest col·lectiu. De totes maneres, com que aquests malalts no han estat seleccionats prèviament, l'alt percentatge de positivitat de DNA-VHB obtingut, ens dóna una idea aproximada de la magnitud d'aquest fet. Aquest percentatge és similar al d'altres estudis realitzats a països de l'àrea mediterrània i notablement superior al dels fets a països anglosaxons (12, 13, 28). A més, no hem detectat DNA-VHB en el sèrum de cap dels portadors sans de HBsAg (tots antiHBe positiu). Aquests resultats suggereixen que dels malalts amb l'antiHBe positiu, són precisament aquests qui presenten lesions d'hepatitis crònica i hipertransaminasèmia els que sovint demostren replicació del VHB, fet que no es dóna pràcticament mai en els portadors sans amb antiHBe positiu.

El 93,9 % dels nostres pacients amb el DNA-VHB sèric positiu, presenten activitat HBcAg en teixit hepàtic, cosa que confirma que la detecció d'aquest antigen al fetge és un bon indicador de l'existència d'activitat replicativa del virus. El princi-

pal inconvenient d'aquest procediment és que obliga a la realització de biòpsia hepàtica, la qual cosa òbviament, no es pot repetir a intervals freqüents. D'altra banda, l'HBcAg sèric és un marcador de replicació relativament poc sensible ja que resulta negatiu en el 22,5 % dels sèrums amb DNA-VHB.

No hem detectat DNA-VHB al sèrum de cap dels donadors de sang ni de cap malalt amb hepatopatia crònica i HBsAg negatiu, cosa que concorda amb els resultats de la majoria d'estudis publicats (7, 12). Això és un argument a favor de l'especificitat del mètode d'hibridació molecular emprat. No obstant, alguns estudis demostren un petit percentatge de positivitat del DNA-VHB al sèrum de pacients amb HBsAg negatiu i hepatopatia crònica (3, 15).

El fet que el 94,3 % dels pacients amb hepatitis crònica pel VHB presentin replicació vírica documentada per la positivitat del DNA-VHB en sèrum confirma la clara associació entre l'activitat replicativa del virus i la presència de lesió hepàtica, en aquest grup de malalts. Això ho corrobora el fet que cap dels portadors sans de l'HBsAg analitzats en aquest estudi presenta replicació del VHB. De totes maneres, no hem aconseguit detectar replicació del VHB al sèrum de 4 pacients antiHBe positius i amb hepatitis crònica. Aquesta dada coincideix amb les d'altres autors de l'àrea mediterrània (13, 25). Malgrat que hom pot suposar, en aquest grup de malalts una sobreinfecció per un virus de l'hepatitis no A no B, o bé l'acció de mecanismes patogènics de caràcter autoimmunitari, no disposem actualment de cap hipòtesi que expliqui de forma consistent la raó de la persistència d'inflamació hepàtica en aquests malalts.

En resum, el mètode d'hibridació molecular emprat en aquest estudi és un procediment senzill, sensible i específic per a la valoració de l'activitat replicativa del VHB. La disponibilitat d'aquest marcador

permetrà aprofundir en aspectes poc coneguts de la història natural de la infecció crònica pel VHB, així com comprovar l'acció antivírica dels fàrmacs utilitzats en estudis terapèutics.

Agraïments

Agraïm la col·laboració del Dr. J. Summers de l'Institute for Cancer Research de Filadelfia, (USA), per la cessió desinteressada de la soga d'*Escherichia coli* que conté el plasmidi pBH20-VHB, a Nuri Artigas per la seva col·laboració en les determinacions dels marcadors convencionals del VHB i al Dr. R. Guerrero per donar-nos el suport material i tècnic del seu departament.

BIBLIOGRAFIA

1. BIRNBOIN, D.C. i DOLY, J. (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmids DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
2. BONINO, F., HOYER, B., i NELSON, J. *i cols.* (1981) Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: a marker of active hepatitis B virus replication in the liver. *Hepatology* 1:386-391.
3. BRECHOT, C., DEGOS, F., LUGASSY, C. *i cols.* (1985) Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigens. *N. Engl. J. Med.* 312:270-276.
4. BURRELL, C.J., MACKAY, P., GREENAWAY, P.J. *i cols.* (1979). Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322. *Nature* 279:43-47.
5. CHARNAY, D., POURCEL, C., LOUISE, A. *i cols.* (1979) Cloning in *Escherichia coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:2222-2226.
6. COSTA, J., SÁNCHEZ TÁPIES, J.M. i MÀS, A. (1986) Utilidad de la determinación en el suero del DNA del virus de la hepatitis B (DNA-VHB) en la infección crónica por VHB. *Gastroenterol Hepatol* 9:15.
7. FREIMAN, J., ECKSTEIN, R., MCCAUGAN, G. *i cols.* (1985) Significance of serum and hepatic markers of hepatitis B viral infection in HBsAg-positive and HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Hepatology* 5:50-53.
8. HADZIYANNIS, S.J., LIEBERMAN, H.M., KARVOUNTZIS, G.G. *i cols.* (1983) Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg vs. antiHBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 3:656-662.
9. HOOFNAGLE, J.H., DUSHEICO, G.M., SEEF, L.B. *i cols.* (1984) Seroconversion from hepatitis Be antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann. Intern. Med.* 94:744-748.
10. HUNTER, W.H. i GREENWOOD, F.D. (1984) Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-496.
11. KAPLAN, P.M., FORD, E.C., PURCELL, R.H. *i cols.* (1976) Demonstration of subpopulations of Dane particles. *J. Virol.* 17:885-893.
12. KARAYIANNIS, P., FOWLER, M.J.F., LOK, A.S.F. *i cols.* (1985) Detection of serum HBV-DNA by molecular hybridization. Correlation with HBeAg/antiHBe status, racial origin, liver histology and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 1:99-106.
13. MONJARDINO, J., KARAYIANNIS, P., MONTANO, L. *i cols.* (1984) Contribution of low level HBV-replication to continuing inflammatory activity in patients with anti-HBe positive chronic hepatitis B virus infection. *Gut* 25:1283-1287.
14. MATSUYAMA, Y., OMATA, M., YOKOSURA, O. *i cols.* (1985) Discordance of hepatitis Be antigen/antibody and hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in serum. *Gastroenterology* 89:1104-1108.
15. NALPAS, B., BERTHELOT, P., THIERS, V. *i cols.* (1985) Hepatitis B virus multiplication in the absence of usual serological markers. A study of 146 chronic alcoholics. *J. Hepatol.* 1:87-89.
16. NEURATH, A.R., STRICK, N., BAKER, L. *i cols.* (1982) Radioimmunoassay of hidden viral antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:4415-4419.
17. OMATA, M., IMAZAKI, F., YOKOSUKA, O. *i cols.* Recombinant leukocyte. An interferon treatment in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 88:870-880.
18. PURCELL, R.H., GERIN, J.L., ALMEIDA, J. *i cols.* (1974) Radioimmunoassay for the detection of the core of Dane particle and antibody to it. *Intervirology* 2:231-243.
19. REALDI, G., ALBERTI, A., RUGGE, M. *i cols.* (1980) Seroconversion from hepatitis B antigen to antiHBe in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 79:195-199.
20. RIGBY, P.W.J., DIECKMANN, RODÉS, C. *i cols.* (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
21. SÁNCHEZ TAPIAS, J.M., VILAR, H., COSTA, J. *i cols.* (1985) Natural history of chronic persistent hepa-

- titis B: relationship between hepatitis B virus replication and the course of the disease. *J. Hepatol.* 1:15-27.
22. SCOTTO, J., HADCHOUEL, M., HERY, C.H. *i cols.* (1983) Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: Comparison with results of other viral markers. *Hepatology* 3:279-284.
 23. SINATRA, F.R., SHAH, P., WEISSMAN, J.Y. *i cols.* (1982) Perinatal transmitted acute icteric hepatitis B virus surface antigen positive and anti-hepatitis B e-positive carrier mothers. *Pediatrics* 70:557-559.
 24. TAKAHASHI, K., IMAI, M., TSUDA, F. *i cols.* (1976) Association of Dane particles with an antigen in the serum of asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 117:102-105.
 25. THIERS, V., BOUCHARDEAN, F., COUROUCE, A. *i cols.* (1986) L'ADN du virus de l'hépatite B comme marqueur de multiplication virale: comparaison avec l'antigène HBe et l'anticorps anti-HBe. *La Presse Médicale* 15:1219-1222.
 26. HOMAS, H.C., i LOCK, A.S.F. (1984) Approaches to the treatment of chronic hepatitis B. A: Advances in hepatitis research. EV Chiari. Ed. Masson Publishing, Inc. New York 241-250.
 27. TREVISAN, A., GUDAT, F., BUSACHI, *i cols.* (1982) An improved method for HBcAg demonstration in paraffin embedded liver tissue. *Liver* 2:331-339.
 28. WELLER, I.V.D., FOWLER, M.J.F., MONJARDINO, J. *i cols.* The detection of HBV-DNA in serum by molecular hybridization: A more sensitive method for the detection of complete HBV particles. *J. Med. Virol.* 9:273-280.
 29. YAMADA, G. i NAKANE, P.K. (1977) Hepatitis B core and surface antigens in liver tissue. Light and electron microscopic localization by peroxidase-labeled antibody method. *Lab. Invest.* 36:649.
 30. ZANETTI, A.R., FERRONI, P., MAGLIANO, E.M. *i cols.* (1982) Perinatal transmission of the hepatitis B virus and of the HBV-associated delta agent from mothers to offspring in northern Italy. *J. Med. Virol.* 9:139-148.