

HETEROGENEIDADE DE RESPOSTA DO HOSPEDEIRO AO VÍRUS DA HEPATITE B

Euzenir Nunes SARNO, Frederico RUZANY, Leila Maria Machado VIEIRA e Jayme LANDMANN

RESUMO

O comportamento de 36 pacientes de uma Unidade de depuração e transplante renal, cuja taxa de ataque pelo vírus da hepatite B era 35% ao ano, foi analisado pelo período de 3 anos. Pesquisaram-se o antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs) e seu anticorpo (anti-HsB) e o anticorpo contra o antígeno central do vírus (anti-HBc) no soro e ambos os antígenos AgHBs e AgHBc no tecido hepático, correlacionando-se estes dados com os aspectos histológicos das biopsias hepáticas. Vinte e dois pacientes mostraram um ou mais dos marcadores imunológicos da hepatite B e são objeto do presente trabalho. Dezesseis apresentaram AgHBs no soro em algum momento do acompanhamento, sendo que em 11 pacientes houve permanente persistência da positividade. A biopsia hepática demonstrou hepatite crônica em 6 destes casos e alterações inespecíficas ou ausência de alterações nos demais. A concomitância de AgHBs e AgHBc em tecido só foi observada em casos de hepatite crônica com uma exceção. AgHBs isolado foi encontrado em lesões hepáticas inespecíficas e em um caso de hepatite crônica persistente. Hepatite viral aguda, tipo B, clinicamente diagnosticada ocorreu em 4 casos, tendo 3 evoluído para cura clínica ou histológica e 1 para hepatite crônica.

INTRODUÇÃO

A resposta do hospedeiro à infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) tem sido analisada em diferentes grupos de pessoas, resultando parâmetros que permitem avaliar a fase e o prognóstico da doença¹¹. Entre os parâmetros séricos, alguns parecem indicar a infectividade, tais como a presença de AgHBe e mesmo o anti-HBc, quando em altos títulos¹⁰ e a persistência por mais de 3 meses de um dos antígenos sugere fortemente evolução no sentido da cronicidade¹².

Ainda não foi determinado o valor diagnóstico ou prognóstico dos antígenos virais teciduais (AgHBs e AgHBc). Alguns Autores^{6,8}, sugerem uma relação inversa entre atividade da doença e a quantidade de células que apresentam aqueles antígenos, sendo observado que nas formas ativas de hepatite crônica ambos

os antígenos são encontrados em proporção equivalente, enquanto nas formas pouco ativas ou mesmo nos "portadores sãos" em geral há predomínio de um dos antígenos.

Algumas evidências indicam diferentes respostas à infecção viral, variando em função da área geográfica, grupo social e concomitância de outra enfermidade¹⁹. Aceita-se hoje que pacientes em tratamento por hemodiálise ou submetidos a transplante renal apresentam alta taxa de infecção⁹, assim como sintomas clínicos e laboratoriais discretos quando infectados pelo VHB¹². Nestes pacientes, raramente se detectam formas agudas clínicas típicas⁵.

A fim de esclarecer o comportamento de pacientes em uma unidade de diálise aberta, em que a taxa de ataque infecção era de 35% ao

ano¹⁵, procedeu-se à análise de marcadores imunológicos séricos e teciduais da HB, correlacionando-os com as alterações histopatológicas observadas em biopsias hepáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados 36 pacientes que, durante o período de 1977-1980, utilizaram a unidade de diálise periódica e o programa de transplante renal do Hospital de Clínicas da UERJ. Destes, 6 haviam sido submetidos a transplante renal, após a primeira biopsia hepática. Todos os pacientes foram estudados clinicamente e submetidos a provas de função hepática periódicas. Todos foram submetidos à biopsia hepática, sendo efetuadas um total de 45 biopsias e 6 necrópsias e, em 8 casos, a biopsia hepática foi feita mais de uma vez. A indicação da biopsia hepática baseou-se nos seguintes critérios: provas funcionais hepáticas alteradas, hepatoesplenomegalia ou presença de um dos marcadores séricos de HB.

Pesquisaram-se AgHBs, anti-HBs e anti-HBc séricos e AgHBs e AgHBc no fígado de todos os pacientes, correlacionando-os com os aspectos histológicos observados nas biopsias hepáticas.

A pesquisa de AgHBs sérico foi feita pelo radioimunoensaio (Ausria II, Abbott Laboratories) e hemaglutinação passiva reversa (Hepanosticon, Organon) e o anti-HBs pelo radioimunoensaio (Ausab, Abbott Laboratories).

Para a pesquisa de AgHBs em tecido, utilizou-se a técnica da Peroxidase-antiperoxidase (PAP)¹⁶. Os cortes após desparafinização e reidratação, eram fixados em acetona fria por 2 min. e, após lavagem em PBS (3 vezes, 3 min. cada), incubados com tripsina 0,1% durante 15 min. a 37°C. Após o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 1% metanol durante 10 min., os cortes eram incubados com soro normal de cabra a 20% durante 20 min. Em seguida eram tratados com anti-AgHBs (Hoechst) 1:2 durante 30 min., a temperatura ambiente. Adicionalmente, eram incubados com anti-coelho (Hoechst) 1:20 (30 min.) e, posteriormente, com PAP (Miles) 1:50 (30 min.). Finalmente, incubados com solução de diaminobenzidina (SIGMA), lavados, desidratados, tratados com xilol e montados com Permunt (Fisher Scientific Comp.).

Para a pesquisa de AgHBc, o procedimento foi semelhante ao anterior, sendo o soro anti-HBs substituído por um soro anti-HBc e os cortes incubados com anti-IgG humano (Hoechst) antes da incubação com o soro anti-coelho. As etapas seguintes foram idênticas às descritas no parágrafo anterior.

Na pesquisa de anti-HBc no soro, foi empregada a técnica de imunofluorescência indireta, utilizando-se fígado como substrato, no qual se detectara previamente a presença de AgHBc¹⁷. Para isto, foram obtidos cortes em criostato, mantidos a 4°C durante 2 h. Após fixação em acetona gelada por 10 min., as secções foram lavadas em PBS (três vezes, 3 min. cada) e incubadas com soros dos pacientes diluídos a 1:2 durante 30 min. a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS (três vezes, 10 min. cada) as secções foram tratadas com soro anti-IgG humano fluoresceínado (Hoechst) por 30 min., à temperatura ambiente. Finalmente, lavados em PBS e montados com Elvanol.

Como controle das técnicas acima descritas, utilizava-se a omissão do anti-soro primário ou a sua substituição por outro da mesma origem e espécie animal mas com especificidade diferente. Quando possível, utilizou-se a absorção dos anti-soros com os antígenos específicos na proporção de 1:1, por 24 horas a 4°C, seguida de centrifugação a 4000 rpm por uma hora.

RESULTADOS

Em 8 pacientes, observou-se icterícia, sendo o diagnóstico da hepatite aguda confirmado em 4 pacientes e o de hepatite crônica em um. Nos demais, a icterícia foi relacionada a uso de drogas ou sepsis. Os níveis de transaminases foram baixos e, mesmo entre os pacientes com hepatite aguda, os níveis máximos mantiveram-se em torno de 400 Unidades Todd.

Dos 36 pacientes, 14 não apresentaram nenhum marcador da HB durante todo o período de acompanhamento, que variou de 1 a 3 anos. Como estes pacientes eram transplantados ou faziam diálise periódica, eram avaliados durante as visitas hospitalares. Os demais 22 pacientes mostraram um ou mais marcadores imunológicos da HB e constituem o objeto do presente estudo. Destes, 14 faziam uso de hemodiálise, sendo que 3 foram transplantados durante o período de estudo, 2 já eram casos de trans-

plante renal desde o início e 3 se tratavam pela diálise peritoneal periódica.

A correlação dos achados séricos (AgHBs, anti-HBs e anti-HBc) e os aspectos clínicos e histológicos observados, permitiram reunir estes 22 casos em 3 grupos.

Grupo I — Anti-HBs positivo desde o início: 3 pacientes (n.º 1, 2 e 3). Dois deles com anti-HBc positivo (n.º 2 e 3). Histologicamente todos tinham hepatite reacional inespecífica (HRI) (Quadro I).

Q U A D R O I

Distribuição dos marcadores imunológicos séricos e teciduais nos pacientes dos Grupos I e II

N.º	Tratamento	HBs soro	Anti HBs	Anti HBc	AgHBs tec.	AgHBc tec.	Diag. Histop.
1	HD	N	+	N	N	N	HRI
2	DP	N	+	+	N	N	HRI
		N	-	N	-	-	
3	HD	N	+	+	N	N	HRI
		N	N	+	-	-	
4	T	N	N	+	N	-	HRI
5	DP	N	N	N	-	-	
		N	-	+	N	N	Alt. mín.
6	HD	N	N	+	N	N	HRI

HD — hemodiálise, T — transplante, DP — diálise peritoneal, HRI — hepatite reacional inespecífica, N — negativo, (—) não foi pesquisado.

Grupo II — Anti-HBc positivo desde o início sem nenhum outro marcador: 3 pacientes (n.º 4, 5 e 6). Histologicamente, todos exibiam HRI (Quadro I).

Grupo III — AgHBs positivo desde o início ou durante o acompanhamento: 16 pacientes. Estes 16 pacientes formaram 5 subgrupos:

Subgrupo A) AgHBs persistentemente positivo: 11 pacientes (Quadro II). Destes pacientes, um apresentou HVA com cura histológica (n.º 7) tornando-se assim "portador". Um exibiu HVA que evoluiu para HCA (n.º 8): outro era doente com HCA desde a 1.ª biopsia e evoluiu para cirrose em 3 anos

(n.º 9). Quatro eram casos de hepatite crônica persistente desde o início (n.º 10, 11, 12, 13). Três apresentavam-se com HRI (n.º 14, 15 e 16) e um com fígado normal (n.º 17).

Q U A D R O II

Distribuição dos marcadores imunológicos séricos e teciduais nos 11 pacientes do subgrupo A do Grupo III

N.º	Tratamento	HBs soro	Anti HBs	Anti HBc	AgHBs tec.	AgHBc tec.	Diag. Histop.
7	HD	+	N	N	N	N	HVA
	T	+	N	+	+	+	Normal
8	HD	+	N	+	N	+	HVA
		+	-	+	+	+	HCA
9	T	+	-	+	+	+	HCA
		+	N	+	+	+	HCA→C
10	HD	+	N	+	-	-	
		+	-	+	+	+	HCP
11	HD	+	N	+	+	+	HCP
12	HD	+	N	+	N	N	HCP
13	HD	+	-	N	+	N	HCP
14	HD	+	N	+	+	N	HRI
	T	+	-	+	+	N	Alt. mín.
15	HD	+	N	+	+	N	HRI
16	HD	+	-	+	+	-	HRI
17	HD	+	N	+	N	N	Normal

HD — hemodiálise, T — transplante, HVA — hepatite viral aguda, HCA — hepatite crônica ativa, HCA→C — hepatite crônica ativa evoluindo para cirrose, HCP — hepatite crônica persistente, N — negativo, (—) não foi pesquisado

Subgrupo B) AgHBs negativando após a cura, 2 pacientes. Ambos sofreram HVA e negativaram o AgHBs sem entretanto, ser detectado o anti-HBs até 6 meses após. Um com cura comprovada histologicamente (n.º 18) e outro com cura clínica após mais de 6 meses de evolução (n.º 19).

Subgrupo C) AgHBs intermitente com fígado normal: um paciente (n.º 20).

Subgrupo D) AgHBs positivo sem clínica de HVA. Doze meses após aparecimento de anti-HBc e anti-HBs: um paciente (n.º 21).

Subgrupo E) AgHBs negativo no 1.º exame; porém com anti-HBc positivo. A partir do 2.º exame tornou-se AgHBs positivo, 1 caso (n.º 22).

Antígenos Teciduais

Os antígenos AgHBs e AgHBc no fígado foram encontrados juntos ou isolados em 9 casos, todos com AgHBs sérico persistentemente positivo, pertencentes ao subgrupo A do Grupo III. Três eram casos de HCP (n.º 10, 11 e 12); 2 com HCA (n.º 8 e 9). Um destes (n.º 8) tivera hepatite aguda, que evoluiu para HCA, e a biópsia na fase aguda demonstrou a presença de AgHBc em raros

núcleos hepáticos isolados. Nos outros 4 casos (n.º 7, 14, 15 e 16), embora um ou os dois antígenos estivessem presentes, não havia lesão histológica característica de nenhuma fase da HB, sendo que em um deles (n.º 7) o fígado era normal. Este último tivera HVA cerca de um ano antes deste exame.

A distribuição dos antígenos presentes, no lóbulo e na célula foi semelhante em todos os casos. O AgHBs foi encontrado predominantemente no citoplasma de hepatócitos, com distribuição lobular tipo salpicado, variando em quantidade de caso para caso (Fig. 1). O AgHBc foi encontrado somente em núcleo em quantidade variáveis (Fig. 2).

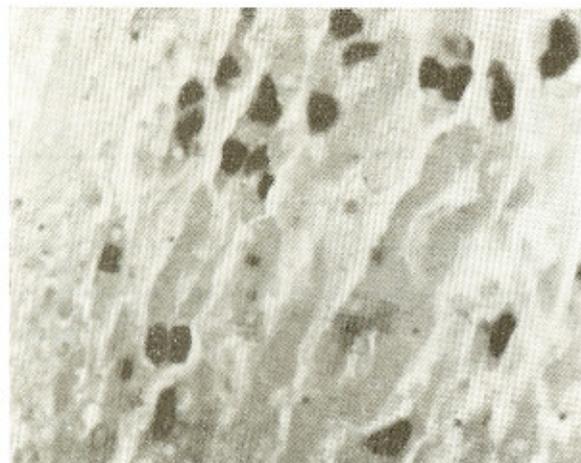


Fig. 1 — Coloração de AgHBs em cortes de fígado incluído em parafina (caso n.º 15). Técnica do PAP (180X)

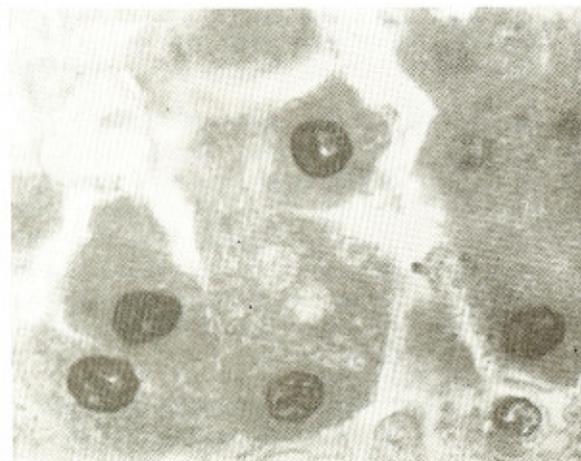


Fig. 2 — Coloração de AgHBc em cortes de fígado com HCA incluído em parafina. Técnica do PAP (320X)

A distribuição dos antígenos teciduais nos pacientes do Grupo III está nos Quadros II e Quadro III.

Nenhum paciente do Grupo I e II apresentou antígeno no tecido.

Q U A D R O III

Distribuição dos marcadores imunológicos séricos e teciduais nos pacientes dos subgrupos B, C, D e E do Grupo III

N.º	Tratamento	HBs soro	Anti HBs	Anti HBc	AgHBs tec.	AgHBc tec.	Diag. Histop.
18	HD	+	N	—	N	N	HVA
	T	N	N	+	N	N	HRI
	T	N	—	N	—	—	
19	HD	+	N	—	—	—	HVA
		N	N	+	N	N	
20	DP	N	N	N	—	—	Normal
		+	N	N	—	—	
		N	N	N	—	—	
		+	N	+	—	—	
21	HD	N	N	N	N	N	HRI
		+	N	+	—	—	
		N	+	+	N	N	
		N	+	+	—	—	
22	HD	N	N	+	N	N	HRI
		+	N	N	—	—	
		+	N	+	—	—	

HD — hemodiálise, T — transplante, DP — diálise peritoneal, HVA — hepatite viral aguda, HRI — hepatite reacional inespecífica, N — negativo, (—) não pesquisado.

OBS: Nos quadros só foram lançados resultados quando, na sucessão, havia dados novos. Não expressa o número de vezes em que cada elemento foi pesquisado.

DISCUSSÃO

O tratamento imunossupressor proporcionado aos pacientes transplantados não parece ter interferido no comportamento geral dos pacientes já que eles se distribuíram em todos os grupos, havendo mesmo paciente que, embora freqüentando a Unidade de Nefrologia durante a vigência de tratamento imunossupressor, não se infectou, ou eliminou o vírus. Outro paciente transplantado, já com HCA, não apresentou alteração do curso da doença, apesar de intensa imunossupressão, vindo a falecer com quadro de cirrose incipiente. Alguns Autores que acompanharam grande número de pacientes transplantados têm apontado alta incidência de doença hepática crônica como causa de óbito¹³. Isto, entretanto, não tem sido encontrado por todos os Autores².

Apesar da variedade de comportamento verificada entre os pacientes desta série, alguns fatos foram evidentes.

Os anticorpos anti-HBs e anti-HBc indicaram contacto prévio com o vírus da HB, po-

rém as suas presenças isoladamente ou juntos não estiveram associadas à doença hepática, quando desacompanhadas de AgHBs sérico. O anti-HBs esteve presente sempre quando ausentes o AgHBs e doença hepática, confirmando seu papel na eliminação do vírus⁴.

Só houve soro conversão de AgHBs para anti-HBs em um caso, ocorrendo mais de um ano após a provável infecção aguda (n.º 21), embora em 3 casos houvesse negativação do AgHBs. É possível que nestes últimos casos, outro sistema de eliminação do vírus estivesse presente, que não o anticorpo específico¹⁸.

Em um paciente, a presença de AgHBs no soro foi intermitente em intervalos que não ultrapassaram 6 meses. Não encontramos explicação para o fato, já que todos os exames foram feitos em duplicata por RIA, o que afasta um possível erro metodológico.

O anti-HBc esteve presente em 20 casos; acompanhou todos os casos com AgHBc no tecido hepático, sugerindo que este anticorpo não teria papel na eliminação do vírus, embora sua presença tanto nas formas agudas, como crônicas, seja um bom marcador de infecção pelo VHB (7) tendo significado semelhante do antígeno "e". Em um caso (n.º 22), a presença deste anticorpo isolado precedeu ao aparecimento do AgHBs, denunciando assim uma provável infectividade daquele soro²⁰. O verdadeiro papel do anti-HBc no curso da infecção viral ainda não está esclarecido, havendo sugestão que estaria relacionado ao tipo de imunoglobulina¹. Os dados obtidos até o momento sugerem que anti-HBc não tem papel importante na resolução da infecção.

Dos 11 pacientes que exibiram persistência de AgHBs, 6 evoluíram com doença crônica, confirmando os relatos na literatura que apontam um valor prognóstico quando o AgHBs permanece no soro por mais de 3 meses¹².

Com exceção de um caso, a concomitância de AgHBs e AgHBc em tecido ocorreu em pacientes com hepatite crônica, sendo 2 com HCA e 2 com HCP. É possível que nestes últimos casos isto signifique um potencial agressivo já que GUDAT & BIANCHI⁴ consideram a forma de "equivalência" como relacionada à HCA. O AgHBs isolado foi encontrado em fígados sem alterações histológicas significativas e em um caso de HCP. Dentro dos critérios de GUDAT &

BIANCHI, a forma denominada "AgHBs predominante" não teria potencial agressivo, com o que concordam nossos achados.

A presença de antígenos teciduais mesmo em pacientes com HRI cujos aspectos histológicos não eram característicos de hepatite por vírus (n.º 14, 15 e 16) sugere que as lesões observadas estejam relacionadas à infecção viral embora só um acompanhamento a longo prazo poderia esclarecer a verdadeira evolução destas lesões. Os pacientes cujas biopsias hepáticas eram normais, podem ser classificados como "portadores crônicos" de AgHBs exibindo alta positividade de AgHBs em tecido (80%), o que confirma os dados da literatura que apontam uma freqüência entre 64 e 100%⁸.

A forma heterogênea de apresentação da infecção pelo VHB é, sem dúvida, o lastro que assegura a dificuldade de compreender esta doença. A interação deste vírus com o hospedeiro humano proporciona toda uma gama de resposta que vai desde a ausência de lesão até formas crônicas ou mesmo à oncogênese. Se considerarmos a população aqui estudada como imunologicamente deficiente^{3,18} explicaríamos a alta incidência da infecção viral, ausência de doença na presença da infecção e a cronicidade, mas não justificariamos com o mesmo argumento alguns outros achados como os casos curados de hepatite aguda em vigência de imunossupressão ou aqueles que nem se infectaram. Do mesmo modo, aquelas situações citadas ocorrem em pacientes que não podem ser apontados como sob imunossupressão, pelos métodos atuais de avaliação, como o que se dá com os chamados "portadores sãos".

Observações futuras envolvendo outros marcadores imunológicos relacionados ao vírus ou avaliadores da própria capacidade de resposta imunológica do indivíduo, realizadas em populações diversas, poderão responder provavelmente a algumas das atuais perguntas.

SUMMARY

Heterogeneity of the host response to Hepatitis B virus

The development of hepatitis B virus infection was analysed in 36 patients of a renal dialysis and transplantation unit, at which the infection rate was of 35% a year. All patients went through one or more hepatic biopsy and

their histologic aspects were correlated to the presence of HBsAg, anti-HBs and anti-HBc in the sera and HBsAg and HBcAg in the hepatic tissue.

22 Of these patients presented one or more of the above mentioned markers of HB virus. 6 Presented anti-HBs or anti-HBc as the sole marker, not having, however a liver disease. 16 Cases carried HBsAg positivity. In 11 cases the HBsAg was positive for more than 6 months: among these, 4 had chronic persistent hepatitis (CPH), 2 had chronic active hepatitis (CAH), 3 had non specific reactive hepatitis and 2 had normal liver.

In the 4 cases the persistence of HBsAg in the sera has not been associated with hepatic lesions and were consistent with "carriers".

The concomitant presence of HBsAg and HBcAg in liver tissue (5 cases) was associated with chronic hepatitis except for one case.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos as Dras. Albanita Viana de Oliveira e Marise Carrapatoso, da Disciplina de Anatomia Patológica da FCM, pela colaboração na análise de biopsias hepáticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BUTHOLD, H.; JONTOFFSOHN, R.; FLEMING, B. & FROHLICE, J. — Anti-HBc IgM: A parameter for latent HBV infection Memo-H 1871, February, 1981.
2. DEGOS, F.; DEGOTT, C.; BEDROSSIAN, J.; CAMILLIERE, J. P.; BARBANEL, C.; DUBOUST, A.; RUEFF, B.; BENHAMOU, J. P. & KREIS, H. — Is renal transplantation involved in pos-transplantation liver disease. *Transplantation* 29: 100-102, 1980.
3. DOBBULSTEIN, H. — Immune system in uremia. *Nephron* 17: 409-414, 1976.
4. EDGINGTON, T. S. & CHISARI, F. V. — Immunological aspects of hepatitis B virus infection. *Am. J. Med. Sci.* 270: 213-228, 1975.
5. GALBRAITH, R. M.; SHEIK, N. el; PORTMANN, B.; EDDLESTON ALWF; WILLIAMS, R.; PARSONS, V.; BEWICK, M. & OGG, C. S. — Immune response to HBsAg and spectrum of liver lesions in HBsAg — positive patients with chronic renal disease. *Brit. Med. J.* 1: 1497-1498, 1976.
6. GUDAT, F.; BIANCHI, L.; SENNABEND, W.; THIEL, G.; AENISHAENSLIN, W. & STALDER, G. — Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. *Lab. Invest.* 32: 1-9, 1975.

SARNO, E. N.; RUZANY, F.; VIEIRA, L. M. M. & LANDMANN, J. — Heterogeneidade de resposta do hospedeiro ao vírus da hepatite B. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 24:303-309, 1982.

7. HOOFNAGLE, J. H.; GERETY, R. J. & NIL, Y. — Antibody to hepatitis B core antigen. A sensitive indicator of hepatitis B virus replication. *New Engl. J. Med.* 290: 1336, 1974.
8. HUANG, S. N. & NEURATH, A. R. — Immunohistologic demonstration of hepatitis B viral antigens in liver with reference to its significance in liver injury. *Lab. Invest.* 40: 1-17, 1979.
9. KANTOR, R. J.; HADLER, S. C.; SCHROEDER, M. T.; BERQUIST, K. R. & FAVERO, M. S. — Outbreak of hepatitis B in a dialysis unit, complicated by false positive HBsAg test results. *Dialysis & Transplantation* 8: 232-236, 1979.
10. KATCHAKI, J. N.; BROUWER, R. & SIEM, T. H. — Anti-HBc and blood infectivity. *New Engl. J. Med.* 298: 1421-1422, 1978.
11. KRUGMAN, S. & GILES, J. P. — The natural history of viral hepatitis. *Can. Med. Assoc.* 106: 442-446, 1972.
12. KRUGMAN, S.; OVERBY, L. R.; MUSHAHWAR, I. K.; LING, C. M.; FROSNER, G. G. & DEISN-NHARDT, F. — Viral hepatitis type B studies on natural history and prevention re-examined. *New Engl. J. Med.* 200: 101-106, 1979.
13. LONDON, W. T.; DREW, J. S.; LUSTBADER, E. D.; WERNER, B. G. & BLUMBERG, B. S. — Host responses to hepatitis B infection in patients in a chronic hemodialysis unit. *Kidney Inter.* 12: 51-58, 1977.
14. RAY, M. B.; DEMET, V. J.; FEVERY, J.; DE GROOTE, J.; BRADBURNE, A. F. & DESMYTER, J. — Distribution patterns of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in liver of hepatitis patients. *J. Clin. Path.* 29: 94-100, 1976.
15. RUZANY, F.; VIEIRA, L. M. M.; SARNO, E. N.; SAMPAIO, J. C. & STURM, A. — Virus da hepatite B em unidade de hemodiálise. *J. Brasil. Nefrol.* 2: 86-90, 1980.
16. SARNO, E. N.; GERECHT, D. & FONSECA, E. B. — Unlabelled antibody enzyme method for HBsAg in liver tissue: Soluble horseradish peroxidase-antiperoxidase complex (PAP). *Rev. Brasil. Med.* 35: 488-490, 1978.
17. SARNO, E. N.; ALVARIZ, F. G.; LIMA, D. L.; RUZANY, F. & PEREIRA, J. L. — Anti-core como indicação de infecção pelo vírus B da hepatite. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 374-377, 1977.
18. SKINHOJ, P.; ALDERSHVILE, J. & HARDT, F. — Humoral and cell-mediated immunity to hepatitis B virus antigen in a Haemodialysis — renal transplantation unit. *Acta Path. Microbiol. Scand. (Sect C)* 85: 401-405, 1977.
19. SZMUNESS, W.; STEVENS, C. E.; HARLEY, E. J.; ZANG, E. A.; OLESZKO, W. R.; WILLIAM, D. C.; SADOVSKY, R.; MORRISON, J. M. & KELLNER, A. — Hepatitis B vaccine. Demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United State. *New Engl. J. Med.* 303: 833-841, 1980.
20. VARGAS, V.; RUIZ, J.; ESTEBAN, R.; PEDREIRA, J. D.; HERNANDY, J. M.; GERARDI, J. & BACARDI, R. — Presence d'anticorps anti-HBc ou cours d'hepatitis à antigenes Australia négatifs. *Nouvelle Presse Med.* 8: 3756, 1979.

Recebido para publicação em 16/3/1981.