

중합효소연쇄반응법에 의한 B형 간염바이러스 DNA 검출과 혈청학적 지표의 비교 검토

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실

이경아 · 정종신 · 이창훈 · 김현숙 · 송경순

=Abstract =

Comparison of the Polymerase Chain Reaction and Serologic Assay for the Detection of Hepatitis B Virus

Kyung A Lee, M.D., Jong Shin Chung, M.T., Chang Hoon Lee, M.D.,
Hyon Suk Kim, M.D. and Kyung Soon Song, M.D.

*Department of Clinical Pathology, College of Medicine
Yonsei University, Seoul, Korea*

Background : Serologic assays for the detection of markers for hepatitis B viral infection have been used routinely in the clinical laboratories since the early 1970's. Negative results with these tests delineate classically a group of viral hepatitis defined as non-A, non-B hepatitis. However, some observations suggest that this group might include HBV or HBV-related viruses. We thus compared the results of Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of hepatitis B virus DNA (HBV-DNA) with the status of serologic markers.

Methods : We analyzed the data from 118 patients referred for the evaluation of serologic markers and HBV-DNA by PCR, over a period from April, 1991 to March, 1994. Serologic markers including HBsAg, HBsAb, HBcAb, HBeAg, and HBeAb were performed with the method of enzyme-linked immunosorbent assay.

Results : Serum HBV-DNA by PCR was detected in 77% of HBsAg-positive cases as

〈접수 : 1994년 11월 30일〉

〈수정본 접수 : 1994년 12월 22일〉

본 연구는 1994년도 연세대학교 의과대학 과별 배정 연구비로 이루어졌음.

*교신저자 주소 : 이 경 아

서울시 서초구 도곡동 6-17

영등재브란스병원 임상병리과 (전화 : 02-3450-2779)

well as in 20% of HBsAg-negative patients. Not only the most patients(91%) with HBsAg and HBeAg positivity, but also, some HBsAg-positive patients(47%) with seroconversion(HBeAg-negative and HBeAb-positive) were found to have HBV-DNA. In 6 cases with positivity only for HBcAb, 2 cases(33%) were found to have HBV-DNA. There was no significant correlation between ALT levels and HBV-PCR results among 125 HBsAg-positive cases($P>0.1$).

Conclusion: The PCR assay seems to be potentially a valuable diagnostic tool for the evaluation of variable serologic status and may help to assess the condition of patients related with HBV infection(Korean J Clin Pathol 1995;15(1):132~8).

Key Words : Polymerase Chain Reaction, Hepatitis B Virus, Viral markers

서 론

1970년대 초반부터 현재까지 B형 간염의 진단 및 추적 관찰을 위하여 B형 바이러스의 표면 항원(HBsAg) 및 항체(HBsAb), e항원(HBeAg) 및 항체(HBeAb), Core 항체(HBcAb) 등의 혈청학적 지표가 임상적으로 널리 활용되어 왔다. 이 중 표면 항원은 바이러스 입자의 체내 증가로 인해 혈청내에서 검출되므로 감염 자체에 대한 진단적 가치가 높은 것으로 여겨져 왔다(1-3). 그러나 때로는 표면 항원의 검출이 반드시 바이러스 입자의 존재를 의미하지는 않는 것으로 밝혀진 바 있다. 또한 감염력 및 혈청학적 전환에 대한 지표로서 여겨지고 있는 e항원 및 항체도 바이러스의 복제능 및 감염능에 대한 절대적 지표가 되지는 않는다. 즉 HBe 항원 양성 환자가 HBe 항체 생성의 혈청학적 전환이 있음에도 불구하고 바이러스의 지속적 복제로 인한 감염능 보유 상태의 가능성을 완전히 배제 할 수 없는 것으로 보고된 바 있다(4-6). 따라서 최근에는 HBV의 감염상태나 복제능력에 대한 보다 정확한 평가를 위해서 분자 생물학적 기법을 이용한 HBV-DNA 검출이 널리 시도되고 있어 그 임상적 의의에 대한 관심이 높은 상태이다. 분자 생물학적 방법으로는 흔히 DNA probe를 이용한 hybridization법과 DNA를 증폭시켜보는 중합효소 연쇄반응법(Polymerase Chain Reaction:PCR)이 시도되고 있다.

이에 저자들은 118명의 환자를 대상으로, B형 간염 바이러스의 pre C/C gene 위치의 primer를 이용한 HBV-PCR 법과 기존에 활용하여 오던 혈청학적 표지자 검사

(viral markers)와의 상관성을 서로 비교 검토함으로써 그 임상적 의의를 고찰하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상

1991년 4월부터 1994년 3월까지 연세 의대 부속 영동 세브란스병원에 내원하여 HBV-PCR 검사가 의뢰된 118예를 대상으로 하였으며, 의무기록지를 통하여 혈청학적 표지자 및 간기능 검사 결과를 후향적으로 조사하였다. 대상환자의 진단은 만성간염(56%)이 가장 많았고 간경화증(14%), 급성간염(5%), 건강보균자(5%), 지방간(5%), 간암(2%) 및 기타질환(14%) 등이었다(Table 1).

Table 1. Clinical diagnosis of cases studied

| Types of disease | No. of cases |
|-------------------|--------------|
| Chronic hepatitis | 66 |
| Liver cirrhosis | 16 |
| Acute hepatitis | 6 |
| Healthy carrier | 6 |
| Fatty liver | 6 |
| Hepatoma | 2 |
| Miscellany* | 16 |
| Total | 118 |

Miscellany* : Alcoholic hepatitis, neonatal hepatitis, SLE, cholecystitis, and nonspecific findings

Table 2. Oligonucleotide sequences used as primers in HBV-PCR

| | | |
|---------|------------------------------------------|---------------|
| 1763 | GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC GTA TAA* | 1763 - 1792** |
| 2032R | CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT | 2032 - 2003 |
| 1778E | GAC GAA TTC CAT TGA CCC GTA TAA AGA ATT | 1778 - 1807 |
| 2017R-B | ATG GGA TCC CTG GAT GCT GGG TCT TCC AAA | 2017 - 1988 |

* All sequences are written in 5' to 3' direction.

** Map positions are according to Fujiyama et al[1983].

2. 방법

1) 혈청학적 표지자 검사

HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb 및 HBcAb 표지자 검사는 상품화된 kit를 사용하여 효소면역(HBsAg/HBsAb:Behring Laboratories, Marburg, W. Germany, HBeAg/HBeAb/HBcAb : Sanofi Diagnostics Pasteur S. A., France)으로 제조원의 방법에 따라 검사하였다.

2) HBV-DNA 검출을 위한 PCR 방법

Sodium Hydroxide 방법에 의한 혈청 DNA 추출 : 10 μ L의 혈청을 microcentrifuge tube에 넣고 0.5 M NaOH 2.5 μ L용액과 37°C에 60분간 작용시킨후 0.5 M HCl을 첨가하여 중화시켰다(2).

Oligonucleotide primers 제조 :

사용된 primer는 pre C/C gene에 위치하는 30 bp의 nucleotide로서 380 A DNA synthesizer(Applied Biosystems, Foster City, CA)로 합성하였다. Primer의 위치 및 서열은 표 2와 같다(Table 2).

PCR Amplification 과 PCR/PCR Technique :

1차 증폭시 추출된 2 μ L의 환자 혈청에 1.0 U Taq polymerase(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT), 4 종류의 deoxyribonucleic triphosphate 각각 200 μ mol/L, primer 1763 과 2032R 각각 1 μ mol/L, 50 mmol/L KCl, 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.01% gelatin을 혼합하고 증류수를 첨가하여 총 부피가 20 μ L되게 하였다. 반응 조건은 DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer Cetus, 9600)를 이용하여 94°C에서 30초간 pre denaturation, 94°C에서 10초간 denaturation, 42°C에서 10초간 annealing, 72°C에서 10초간의 extension 과정을 30회 반복한후 마지막으로, 72°C에서 5분간 반응시켰다. 1차 증폭결과 음성인 경우 2 μ L의 1차 산물에 primer 1778E 와 2017R-B를 사

용 하여 다시 위와 동일한 방법으로 재증폭 하였다(PCR/PCR technique). 매 검사 마다 양성, 음성 대조 혈청에서도 동일한 방법으로 검사하였다. 모든 검사 과정 중 소량의 오염으로도 위양성 결과가 초래될 수 있으므로 모든 시약은 새 용기를 사용하여 무균 조작하였다.

증폭된 DNA의 분석 :

증폭된 PCR 산물을 1분간 원침 후 10 μ L를 취하여 6 μ L의 loading dye와 함께, 1.5% agarose gel에서 marker 와 함께 100 V/40min.동안 전기영동을 시켰다. Ethidium bromide(EB)로 염색하여 ultraviolet light transilluminator로 관찰 하고 사진을 찍었다. 결과해석 은 1차 증폭산물인 270 bp와 2차 증폭산물인 258 bp 중 하나 이상의 band가 보이면 양성으로 판독하였다. 확인 검사로서 증폭된 산물에 대하여 digoxigenin으로 표지된 HBV-DNA probe로 slot blot 및 hybridization법으로 확인하였다.

결 과

1. HBsAg 검사와 HBV-PCR 결과 비교

총 118예 중 98예에서 HBsAg 양성, 20예는 음성이었다. 98의 HBsAg 양성 예 중 75예(77%)가 HBV-PCR 양성 을 보였고, 23예(23%)가 HBV-PCR 음성이었다. HBsAg 음성 20예 중 4예(20%)가 HBV-PCR 양성을 보였다.

2. HBsAg 양성예에서 HBeAg/HBeAb와 HBV-PCR 결과 비교

HBsAg 양성이면서 HBeAg이 양성인 66예 중 60예(91%)가 PCR 양성이었고, HBeAb양성 27예 중 15예(56%)가 PCR 양성이었다. HBsAg 양성 중 HBeAg과 HBeAb가 모두 검사에 포함된 73예에서의 HBV-PCR

Table 3. Prevalence of positivity for HBV-PCR in patients with positivity for HBsAg

| Serologic pattern | No. of cases | positivity (%) |
|-------------------|--------------|----------------|
| HBeAg(+)/HBeAb(-) | 44 | 40(91) |
| HBeAg(-)/HBeAb(+) | 17 | 8(47) |
| HBeAg(+)/HBeAb(+) | 10 | 8(80) |
| HBeAg(-)/HBeAb(-) | 2 | 0(0) |

Table 4. Prevalence of positivity for HBV-PCR in patients with negativity for HBsAg

| Serologic pattern | No. of cases | positivity (%) |
|-------------------|--------------|----------------|
| HBeAg(+)/HBeAb(-) | 1 | 1(100) |
| HBeAg(-)/HBeAb(+) | 6 | 6(100) |
| HBeAg(+)/HBeAb(+) | 9 | 2(22) |
| HBeAg(-)/HBeAb(-) | 4 | 4(100) |

Table 5. Comparison between serum alanine transferase(ALT) levels and HBV-PCR positivity with positivity for HBsAg

| HBV-PCR | ALT levels (U/L) | | | Total |
|-------------|------------------|---------|---------|---------|
| | <35 | 35-70 | >70 | |
| positive(%) | 8(62) | 22(79) | 45(79) | 75(77) |
| negative(%) | 5(38) | 6(21) | 12(21) | 23(23) |
| Total | 13(100) | 28(100) | 57(100) | 98(100) |

* Positive incidences for PCR were not statistically significant among groups of different serum ALT levels(p=0.177).

결과는 표 3과 같다. 즉, HBeAg 양성 /HBeAb 음성인 44예에서 PCR 양성 40예(91%)로 가장 높은 양성율을 보였으며, HBeAg 음성/HBeAb 양성 17예 중에서도 8예(47%)가 PCR 양성을 보였다. 또한 HBe 항원 및 항체가 모두 양성인 10예 중 8예(80%)에서도 PCR 양성이었다. HBe 항원, 항체 모두 음성인 2예는 모두 PCR 음성이었다(Table 3).

3. HBsAg 음성에에서 HBsAb/HBcAb와 HBV-PCR 결과 비교

HBsAg 음성 20예 중 HBsAb 양성/HBcAb 양성인 9예에서 2예가 HBV-PCR 양성을 보였고, HBsAb 음성 /HBcAb 양성 6예 중 2예가 HBV-PCR 양성이었다. HBsAb와 HBcAb 모두 음성인 4예는 PCR도 모두 음성이었다(Table 4).

4. HBsAg 및 HBeAb 양성에서 ALT와 HBV-PCR 결과 비교

98예의 HBsAg 양성환자와 27예의 HBsAg 양성 /HBeAb 양성환자에서 χ^2 -test분석에 의한 ALT 수치와 HBV-PCR 결과에는 통계학적으로 유의한 차이(P>0.1)가 없었다(Table 5, 6).

고 찰

B형 간염은 만성으로 진행될 경우 성인의 주요 사망원인이 되는 간경화증, 간세포암 및 간부전증 등을 초래할 수 있으므로 HBsAg, HBeAg, DNA polymerase, HBV-DNA 검출 등, 여러종류의 표지자 검사를 통하여 조기진단과 질환의 상태를 추정하는 것이 중요하다 하겠다. 이들 중 HBsAg은 간염 진단에 일차적 표지자로 이

Table 6. Comparison between serum alanine transferase(ALT) levels and HBV-PCR positivity with positivity for HBsAg and HBeAb

| HBV-PCR | ALT levels (U/L) | | | Total |
|-------------|------------------|--------|---------|---------|
| | <35 | 35-70 | >70 | |
| positive(%) | 4(57) | 3(60) | 9(60) | 16(59) |
| negative(%) | 3(43) | 2(40) | 6(40) | 11(41) |
| Total | 7(100) | 7(100) | 15(100) | 27(100) |

* Positive incidences for PCR were not statistically significant among groups of different serum ALT levels(p>0.1).

용되어 왔으나 바이러스의 증식이나 감염능 평가에는 큰 도움을 주지 못한다. 또한 비교적 감염상태를 잘 반영해주는 표지자로 알려진 HBeAg이 있으나 이는 간접적인 방법으로 HBV-DNA를 직접 검출하는 방법에 비해 예민도가 떨어진다(1-6). HBV-DNA를 직접 검출하는 방법에는 크게 dot 혹은 slot hybridization법과 PCR 방법이 있는데 hybridization 방법보다는 PCR이 더욱 예민한 방법으로 평가되었다. 즉 dot 혹은 slot hybridization은 10² pg 정도의 바이러스를 검출할 수 있었던 것에 비해 PCR은 10⁴ pg 까지도 검출이 가능해졌다(7-11). 본 연구에서 HBsAg이 양성인 모든 검체 중 77%가 PCR 양성이었다. 이 결과는 Kaneko 등에 의한 78%의 양성률과 거의 일치하였으며(2), 이는 conventional hybridization 방법에 비해 높은 양성률이었다. 그러나 다른 위치의 시발체를 사용하여 90% 이상의 예민도를 보고한 최근 연구들에 비하면 비교적 낮은 양성률임을 알 수 있다(7-12). 이러한 양성률의 차이는 사용된 시발체의 위치와 종류에 따른 결과로 생각되었다. 즉 90% 이상의 높은 양성률을 보인 연구에서는 대부분 surface gene과 core gene을 함께 포함하는 시발체를 이용한 반면, 본 연구와 Kaneko 등의 연구에서는 공히 preC/C gene의 일부만이 포함되어 있었다. 따라서 시발체 위치의 선정이 PCR 양성률을 결정하는 중요한 요소임을 알 수 있다.

본 연구에서 HBsAg 양성인 검체 중 HBeAg이 양성인 경우 91%로 높은 양성률을 보여주었다. HBsAg 양성인 HBeAg 음성/HBeAb 양성인 군에서는 PCR 양성률이 47%로서 Brechot등에 의한 50%의 양성률과 비슷한 결과였으며(12) Kaneko 등에 의한 72%의 결과에 비해 낮은 양성률이었다(2). 이러한 결과들을 통해, HBsAg 양성환자가 HBeAg 양성이었다가 HBeAb 양성으로 혈청학적 전환이 일어난 경우라도 계속 복제능력이

있어 감염력을 가질 수 있음을 알 수 있다. 즉, HBeAb 출현은 복제되고 있는 HBV의 양적 감소를 뜻할 수는 있으나 완전한 HBV 소멸을 의미하지는 않는다는 것을 알 수 있다. 또한 preC gene 영역의 점돌연변이로 인해 HBeAg 형성 자체에 이상이 생긴 경우 HBeAg 음성/HBeAb 양성인 표지자 상태를 나타낼 수 있다(13). 이러한 경우는 실제로 만성 감염에 있어서 재활성화의 가능성이 있는 것으로 보고된 바 있다(14). 따라서 만성 감염의 재활성화 징후가 있을 경우 혈청학적 검사상 HBeAg 음성인 경우라도 재활성화 판정을 위해서는 보다 예민한 PCR 검사를 실시함이 필요할 것으로 생각된다(15-16).

한편 HBsAg 음성 예 중 20%가 PCR 양성이었는데 이는 HBV에 의한 만성 감염 환자의 일부에서 볼 수 있는 혈청학적 검사의 위음성 결과로 해석된다. 실제로 Brechot등에 의해 HBsAg 음성 환자에서 HBV-DNA 증식이 보고된 바 있다(17). 특히 이러한 위음성 결과는 건강한 공혈자에서 HBsAg 음성인 반면 HBV-PCR 양성인 경우, 수혈후 감염에 대한 보고가 있어 주의를 요한다(18-19). 또한 HBsAg 음성인 경우 HBeAb가 출현하면 감염 상태로부터 회복된 것으로 흔히 해석할 수 있는데 본 연구에서는 이런 경우에서 30%에서나 PCR 양성을 보여 HBV 감염 상태가 지속되는 것으로 판단되었다. 이에 비해 HBeAb 음성인 경우에 있어서는 모든 예에서 PCR 양성이었다.

HBV에 대한 혈청학적 검사 결과 다른 표지자는 모두 음성임에도 불구하고 HBeAb만이 양성인 경우, 소량의 HBsAg을 갖는 보균자이거나 과거 감염의 두가지 해석이 가능하다. 그러나 실제 바이러스 입자의 수, 복제능력, 감염력에 대해서는 알 수 없다. 본 연구결과에서 이러한 6명의 HBeAb 양성 환자 중 2명에서 양성을 보여 과거 감염보다는 현재 감염 상태임을 시사하였다. Gross등도

HBeAb만이 양성인 환자들 중 39%에서 PCR 양성임을 보고한 바 있다(20).

간 기능 검사인 serum alanine transaminase(ALT)의 수치와 PCR 양성률의 상관성을 살펴보았다. Karin등은 HBeAb 양성인 만성 보균자에서 ALT 수치와 PCR 양성률간에 상관 관계가 있다고 보고한 바 있으나(21) 본 연구에서는 HBsAg 양성인 경우와 HBsAg 양성이면서 동시에 HBeAb 양성인 경우 공히 ALT 수치와 PCR 결과간에 상관관계는 없었다. 이러한 결과로부터 PCR 위양성의 가능성을 생각할 수 있다.

본 연구결과 HBsAb 음성인 경우와 HBsAg 양성/HBeAb 양성인 경우 각각 20%와 47%에서 PCR 양성하였고, HBeAb만이 양성인 경우에도 30%에서 PCR 양성임이 확인 되었다. 따라서 보다 감염 상태를 잘 알기 위해 PCR이 유용한 방법이라 생각된다. 향후 보다 적절한 시발제 선정을 통해 양성률을 높임으로써 혈청학적 검사를 보완하여 진단적 가치를 높일 수 있다.

요 약

배경: B형 간염바이러스의 감염진단을 위해 임상검사로 널리 사용되고 있는 혈청학적 표지자 검사는 감염 상태나 복제능력에 대해 절대적인 지표는 될 수 없으며 음성 결과를 보인 경우에도 감염 상태에 있거나 바이러스 재활성화의 가능성을 배제할 수는 없다. 그러므로 HBV-DNA를 검출하는 예민도 높은 검사로 평가되고 있는 PCR법과 혈청 표지자 검사를 비교하고자 한다.

방법: 1991년 4월부터 1994년 3월까지 영동세브란스병원에 내원하여 HBV-PCR을 시행한 118명을 대상으로 혈청학적 표지자 검사결과를 조사하였다. NaOH 추출방법으로 DNA 정제 후, 1763, 2032R, 1778E, 2017R-B (Pre-C/C gene)의 primer들을 사용하여 PCR 증폭을 시행하고 (PCR/PCR 법), agarose gel 에서 전기영동을 시행한 후 UV light fluorescence를 관찰 하였다.

결과: HBsAg 양성환자에서 PCR 양성률은 77%였고 음성환자에서도 20%가 PCR 양성이었다. HBsAg 양성/HBeAg 양성일 때 91%가 PCR 양성이었다. HBsAg 양성/HBeAb 양성으로 혈청학적 전환이 일어난 예 중 47%가 PCR 양성하였고 HBeAb만이 양성인 경우 6명 중 2명이 PCR 양성이었다.

결론: PCR은 HBV-DNA를 검출하는 예민한 방법이

며 민감도를 높이기 위해서는 primer의 선택이 중요한 요소이다. 이미 밝혀진 바와 같이 표지자 중 HBeAg 양성률과 가장 상관성이 있었으며, HBsAg 양성/HBeAg 음성/HBeAb양성, HBsAg 음성/HBsAb 음성/HBeAb 양성, HBsAg 음성/HBsAb 양성 등 다양한 표지자 상태에서 감염 상태 및 복제 능력을 판단하는데 PCR법이 유용하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. 이혜수, 카알 위트워. 종합효소연쇄반응법에 의한 B형 간염바이러스의 검출에 관한 연구. 대한임상병리학회지 1993;13:617-23.
2. Kaneko S, Miller RH, Di Bisceglie AM, Feinstone SM, Hoofnagle KH, Purcell RH. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. Gastroenterology. 1990;99:799-804.
3. Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM, Unoura M, Kobayashi K, Hattori N. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patient with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:312-6.
4. Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. J Clin Microbiol 1989;27:1930-3.
5. Baginski I, Ferrie A, Watson R, Mack D. Detection of hepatitis B virus. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols - A Guide to methods and Applications. 1st ed. San Diego, California: Academic Press, Inc, 1989:349-55.
6. Bonino F, Colloredo Mels G, Bellati G, Ideo G, Oliveri F, Colombatto P, et al. Problems in diagnosing viral hepatitis. Gut 1993;supplement:S36-S38.
7. Yokosuka O, Omata M, Hosoda K, Tada M, Ehta T, and Ohto M. Detection and Direct Sequencing of Hepatitis B Virus Genome by DNA Amplification method. Gastroenterology 1991;100:175-81.
8. Mitsuda T, Mori T, Ookawa N, Aihara Y, Kosegi K, Yokota S, et al. Demonstration of mother-to-infant transmission of hepatitis B virus by means

- of polymerase chain reaction. *Lancet* 1989;2:886-8.
9. Ulrich PP, Bhat RA, Seto B, Mack D, Sninsky J, Vyas GN. Enzymatic amplification of hepatitis B virus in serum compared with infectivity testing in chimpanzees. *J Infect Dis* 1989;160:37-43.
 10. Zeldis JB, Lee JH, Mamish D, Finegold DJ, Sircar R, Ling Q, et al. Direct method for detecting small quantities of hepatitis B virus DNA in serum and plasma using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1980;84: 1503-8.
 11. Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR. Rapid identification of low level hepatitis B-related viral genome in serum. *J Clin Invest* 1989;84:230-5.
 12. Brechot C. Polymerase chain reaction for the diagnosis of viral hepatitis B and C. *Gut* 1993;supplement:S39-S44.
 13. Santantonio T, Jung MC, Miska S, Pastore G, Papa GR, Will H. Prevalence and type of pre-C HBV mutant in anti-HBe positive carriers with chronic liver disease in a highly endemic area. *Virology* 1991;183:840-4.
 14. Gayno S, Marcellin P, Loriot MA, Peignoux M, Levy P, Erlinger S, et al. Detection of serum HBV-PCR by polymerase chain reaction in patients before reactivation of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1992;14:357-60.
 15. Davis GL, Hoofnagle JH, Waggoner JG. Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1984;86: 230-5.
 16. Di Bisceglie AM, Waggoner JG, Hoofnagle JH. Hepatitis B virus DNA in liver of chronic carriers. *Gastroenterology* 1987;93:1236-41.
 17. Brechot C, Degos F, Lugassy C, Thiers V, Zarrani S, Franco D. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *New Engl J Med* 1985; 31:270-6.
 18. Sun CF, Pao CC, Wu SY, Liaw YF. Screening for hepatitis B Virus in Healthy Blood Donors by Molecular DNA Hybridization Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26:1848-52.
 19. Wang JT, Wang TH, Sheu JC, Shih LN, Lin JT, and Chen DS. Detection of Hepatitis B Virus DNA Polymerase Chain reaction in Plasma of Volunteer Blood Donors Negative for Hepatitis B Surface Antigen. *The Journal of Infectious Disease.* 1991;163:397-9.
 20. Gross A, Joller-Jemelka HI, Wicki AN, Grob PJ. Hepatitis serologic finding "anti-HBe alone", circulating viral DNA and interpretation of findings. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1993;123(23):1193-202.
 21. Ljunggren KK, Nordenfelt E, Kidd A. Correlation of HBeAg/Anti-HBe, ALT Levels and HBV-DNA PCR results in HBsAg-positive patients. *J Med Viro* 1993;39:297-302.