

MORFOLOGIE ANTIGENU HEPATITIDY B A JEHO IMUNO-KOMPLEXŮ

A. JELÍNKOVÁ, M. NOVÁK, R. HELM, R. BENDA a M. MÁCHOVÁ

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

Teprve v nedávné době byl definitivně a komplexním způsobem charakterizován virus (virion) hepatitidy typu B (HBV). Je to kulatá částice s rozměrem 42–45 nm, složená z vnitřku o průměru 27–28 nm (nukleokapsida) a obalové vrstvy silné 7–8 nm. Vnitřek, resp. genetické centrum částice HBV, obsahuje virovou DNA cirkulárního typu, polymerázu DNA a ochranný proteinový komplex, tzv. vnitřní antigen (HBcAg). Zevní plášť virionu (obal) je reprezentován odlišným antigenním komplexem, tzv. povrchovým antigenem (HBsAg), který obsahuje vedle proteinové směsi malý podíl glycidů a značnou proporcii lipidů; HBsAg svými biofyzikálními i dalšími vlastnostmi se chová jako lipoprotein. Jestliže HBcAg je po imunologické stránce u každého kmene HBV identický, pak HBsAg má vedle skupinové (typové) antigenní determinanty řadu subdeterminantů, které se různě kombinují v subtypy.

Ne všechny virionům podobné částice 42 až 45 nm (tzv. Daneovy částice) jsou však infekční; pokud je jejich kapsida „prázdná“, tj. bez virové DNA, resp. bez polymerázy DNA, mluvíme o inkompletní virové částici. Taková partikule sedimentuje pomaleji než částice plnohodnotné, tzn. v rovnovážném hustotním gradientu se vrství v řidší zóně, a při elektroforesis mikroskopickém (EM) zobrazení má pro neutrální průchodný střed. Partikule s částečně nebo zcela neprostupným vnitřkem se považují za infekční.

Replikační cyklus HBV v jaterní buňce je nevyvážený. Nejcharakterističtějším znakem toho je, že infikované hepatocyty obvykle syntetizují — oproti kvantu HBcAg a zejména pak oproti množství molekul nové virové DNA — velký přebytek HBsAg. Proto se HBsAg jako mnohonásobně nadbytečný vyplavuje do krevního oběhu, v němž je detekovatelný imunologickými metodami a rovněž morfoloicky, a to ve formě velkého množství (10^6 – 10^{13}) okrouhlých částic 18–22 nm na 1 ml krve, za variabilního přimíšení různě dlouhých vláken stejné tloušťky. Je samozřejmé, že obě tyto korpuskule HBsAg jsou neinfekční, podobně jako inkompletní Daneovy částice.

Poměr Daneových částic nebo přesněji poměr plnohodnotných infekčních virionů HBV k neinfekčním malým okrouhlým i vláknitým formám HBsAg dohromady kolísá ve velice širokém rozmezí. Obvykle v krvi nacházíme 0,1 % až asi 1,2 % Daneových částic, a jen zřídka více (do 5 %) a zcela výjimečně pak mnoho (např. 10–50 %); zhusta však nemůžeme nalézt v krvi žádné Daneovy částice, ne-

bo je vidíme jen zcela výjimečně, v podílu pod 0,1 % všech částic. Úplně přibližně zobecněno bývá Daneových částic tak asi miliónkrát méně nežli malých a vláknitých partikul HBsAg dohromady. Z toho vyplývá, že krev některých nemocných či nosičů je velice málo infekční, zatímco krev jiných můžeme přenést onemocnění ještě při jejím naředění 10^{-6} nebo 10^{-7} i mnohem více.

Za přirozených podmínek mohou vznikat v krvi — interakcí HBsAg s protilátkami anti-HBs — specifické imuno-komplexy. Vzhledem k tomu, co bylo shora řečeno o antigenní skladbě částic HBsAg i povrchu částic Daneových, je zcela pochopitelné, že imuno-komplexy obsahují všechny typy částic nalézaných v séru; máme-li k dispozici mikroskop o vysoké rozlišovací schopnosti a zvětšíme-li dostatečnou měrou dobře ostřený snímek, můžeme vidět mezi naléhajícími částicemi příčné můstky, tj. molekuly protilátek. Tvorba imuno-komplexů reakcí HBsAg s anti-HBs je možná samozřejmě i in vitro, jestliže k séru s obsahem HBsAg přidáme příslušné protilátky. Velké agregáty se nazývají komplexy typu přebytku protilátky, malé naopak jsou komplexy typu přebytku antigenu.

Na rozdíl od imuno-komplexů HBsAg-anti-HBs nemohou komplexy HBcAg-anti-HBc vznikat v cirkulaci, ale pouze in vitro, protože kapsidy, resp. nukleokapsidy HBV, vybavené vnitřním antigenem, se v krevním oběhu nevyskytují; volné je lze vidět pouze v řezech jádry infikovaných hepatocytů. Teprve během průchodu cytoplazmou se opláštějí povrchovým antigenním „poolem“, čímž se morfoloicky a zřejmě i funkčně kompletují. Jaká je funkce tzv. e-antigenu a protilátek anti-e při tvorbě imuno-komplexů, není ještě rozhodnuto, neboť se dosud definitivně neví, co tento solubilní antigen, rovněž specificky vztažený k infekci HBV, představuje.

Jestliže vše shora uvedené lze považovat za jakýsi nejobecnější souhrn **současného** poznání HBV a jeho replikace v buňce a zčásti i exprese v buňce a organismu, pak **výchozí data o morfologii** HBV, jakož i o struktuře jeho morfoloických podjednotek a jejich imuno-komplexů byla přinesena již pracemi z konce 60. a začátku 70. let (5, 12, 2, 4, 3, 1, 9, 11, 14, 7, 22, 10, 8, 13, 20, 17). Z těchto studií jsme vycházeli, když jsme se v roce 1975 seznámili s morfoloickým průkazem HBsAg. Od začátku jsme hledali v EM vizualizaci HBsAg, resp. HBV prostředek diagnostického využití. První výsledky tohoto snažení jsou proto věnovány možnosti upřesňování diagnó-

zy a prognózy čerstvých a zejména i chronických případů hepatitidy B s pomocí imunní EM (6). Souběžně s klinickým studiem jsme upřesňovali náročnou technologii průkazů negativně barevného HBV a HBsAg i jejich imuno-komplexů. Vstupní část této metodologie je popsána ve studii Nováka a sp. (19), morfologický doplněk práce pak představuje předkládané sdělení. Shrnujeme v něm více než 3leté zkušenosti s vlastním EM znázorněním částic HBV a HBsAg včetně jejich imuno-komplexů s anti-HBs, přičemž pozornost chceme věnovat popisu struktury sledovaných objektů.

Materiál a metody

Od roku 1975 bylo postupně zpracováno a vyšetřeno v EM přes 140 vzorků sér od pacientů s hepatitidou B; většina akutních případů byla charakterizována přechodnou antigenémií, chronická onemocnění měla trvalý výskyt HBsAg. Antigenémie byla kontrolována protisměrnou imuno-elektroforézou, u některých vybraných pacientů z období 1977–78 však již i reverzní pasivní hemaglutinací, popřípadě radioimunologickým vyšetřením.

Každé vyšetřované sérum, uchovávané při -20°C po 1 měsíc až 3 roky, bylo po přečištění krátkodobou centrifugací při 10 000 ot./min. rozděleno na dva díly po 0,25 nebo 0,5 ml. K prvnímu z nich byl přidán stejný objem fosfátového fyziologického roztoku pH 7,2 (PBS), k druhému též objem komerčních prasečích protilátek anti-HBs v ředění 1:2. Po rozmíchání se směsí nechaly stát přes noc při $+4^{\circ}\text{C}$. Ráno byly vzorky doplněny PBS na volum 2 ml, šetrně rozmíchány a $2\times$ centrifugovány za chladu při 25 000 G (15 000 ot./min.) 1 hod. Konečný sediment, resuspendovaný v 0,05 ml PBS, byl smíchán ana partes se 6% kyselinou fosfowolframovou pH 6,5 a směs byla nanášena na 2–3 formvarem potažené a pouhlikované sítky průměru 3 mm o 400 otvorech. Po ozáření UV světlem byly preparáty na sítkách prohlíženy v EM JEM 7A při napětí 80 kV.

Ostatní technické podrobnosti včetně pokusu o zavedení rychlejší a jednodušší metody podle Kelena a sp. (16) jsou popsány v předcházející metodické studii Nováka a sp. (19). Zde lze nalézt rovněž přijatá kritéria pro stanovení hustoty částic a distribuce jejich morfologických typů na povrchu sítěk, jakož i způsob hodnocení přítomnosti a četnosti imuno-komplexů.

Výsledky

Naše EM pozorování negativně barvených, zakonzentrovaných a promytých částic z HBsAg-pozitivních sér, ať smíchaných s PBS nebo s anti-HBs, potvrzují existenci dříve popsaných tří základních morfologických forem, jimiž jsou:

a) prevalující malé, okrouhlé, solidní a pleomorfní částice velikosti 17–22 nm;

b) vlákna stejného průřezu jako malé částice, o délce až několika set nm;

c) viru podobné Daneovy částice (DČ), měřící 42–45 nm, s obalem 7–8 nm a různě elektron-denzním středem rozměru 27 až 28 nm.

První dva typy částic a obal DČ reprezentují povrchový antigen (HBsAg), vnitřek DČ pak vnitřní antigen HBV (HBcAg).

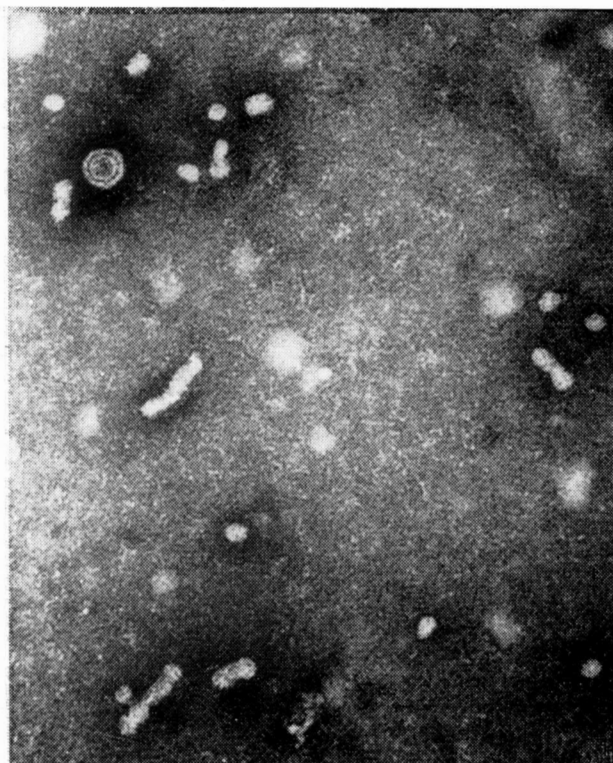
Ve vzorcích sér, k nimž nebyly přidány anti-HBs, ale pouhý PBS, se jednotlivé morfologické formy HBsAg, resp. HBV nejčastěji vyskytují v disperzním uspořádání při různé hustotě (obr. 1, 5). Někdy je však můžeme vidět ve shlucích, většinou o malém počtu částic (obr. 2), ale též v agregátech obsahujících až několik set částic (obr. 3). Jde o tzv. cirkulující imuno-komplexy, které se vyskytují u akutních forem hepatitidy B častěji ve fázi vrcholu klinických příznaků nežli při jejich odeznívání nebo po odeznění, a u chronických forem hepatitidy B výrazně častěji při onemocněních s progredujícím zánětem nežli za stavu stabilizované mírné (persistentní) hepatitidy nebo klinicky bezpříznakového nosičství HBsAg; u stavů pravého bezpříznakového nosičství (s normálními hladinami transamináz a negativním či téměř negativním nálezem při jaterní biopsii) imuno-komplexy nikdy nejsou přítomny.

Sledovali jsme též distribuci jednotlivých částic v cirkulujících imuno-komplexech. Ve většině agregátů jsme nacházeli v prevalujícím podílu malé částice a občas vlákna a DČ (obr. 3). U několika pacientů jsme však našli shluky, obsahující téměř výhradně DČ a místy vlákna (obr. 4, 5, 6); tyto případy odrážejí vždy těžký průběh infekce se silnou imunologickou reakcí a tím i s nepříliš příznivou prognózou.

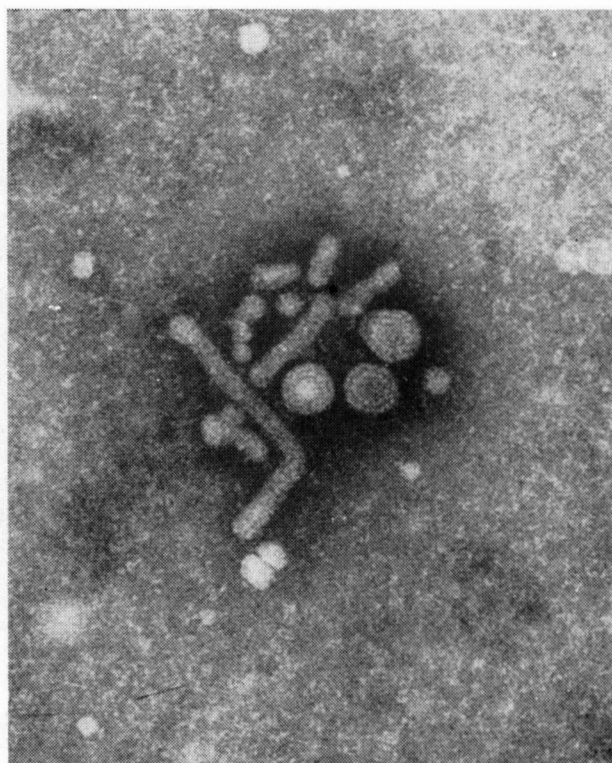
V sérech, k nimž byly přidány anti-HBs, jsme nacházeli imuno-komplexy zpravidla velkých rozměrů, mezi nimiž byly střední i malé shluky (obr. 7) nebo i jednotlivé částice (obr. 8). Nejde tu samozřejmě o cirkulující imuno-komplexy, ale o imunní agregáty vzniklé až arteficiálně in vitro. Zastoupení jednotlivých typů částic v těchto imuno-komplexech bylo dosti uniformní (obr. 7). Komplexy byly složeny zejména z malých částic, porůznu se vyskytující vlákna a DČ, jejichž počet ale nepřesahoval 2 %; tato poslední skutečnost — v relaci k častému vyššímu podílu DČ v cirkulujících imuno-komplexech — je velice významnou zkušeností, kterou zatím neumíme uspokojivě vysvětlit. Považujeme ji však za důležitý podnět k dalšímu výzkumu.

Struktura samotných částic se rovněž nijak zvlášť nelišila od popisů v starších pracích.

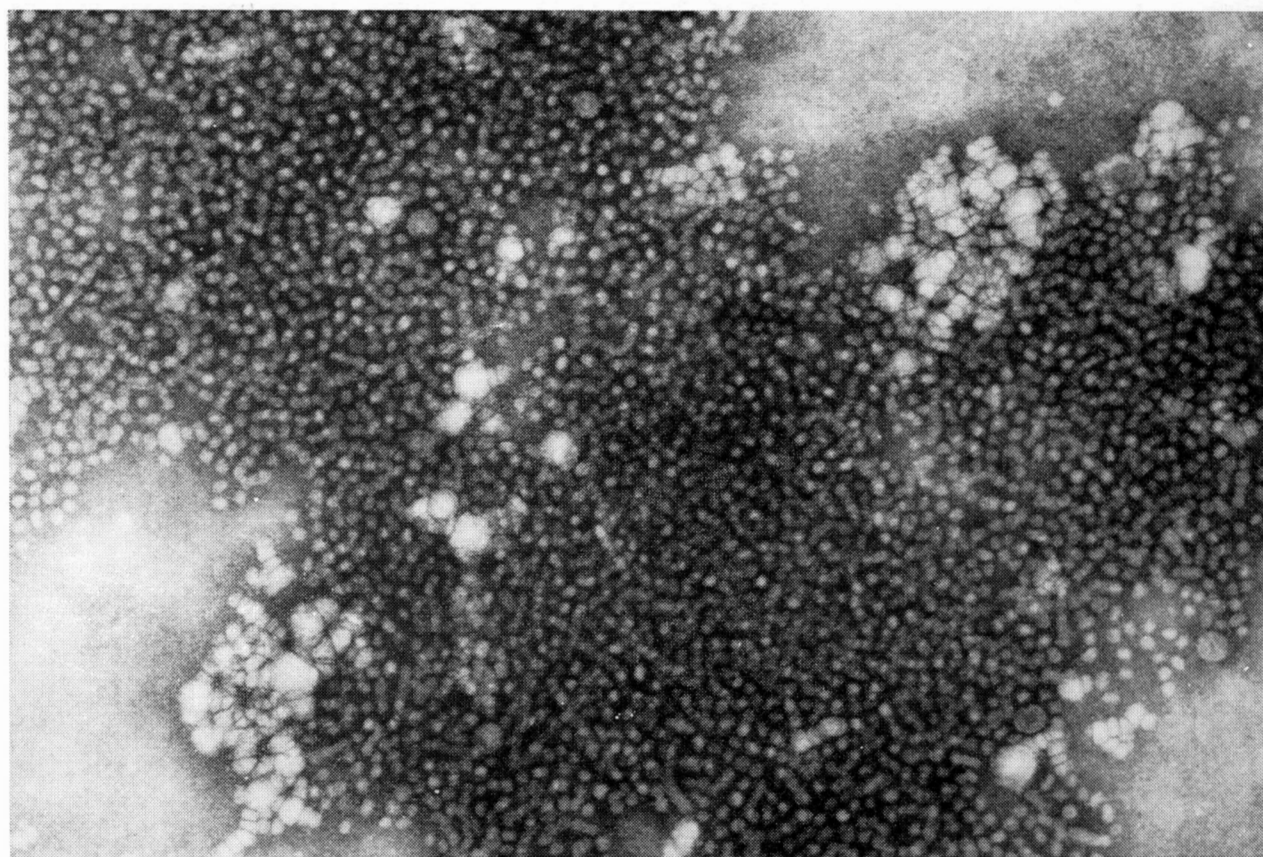
Malé částice byly většinou solidní, ale někdy jsme je nacházeli s jakoby prázdnými středy. Většinou byly kulaté, ale při větším zvětšení jsme mohli pozorovat i oválné partikule nebo částice nepravidelného tvaru.



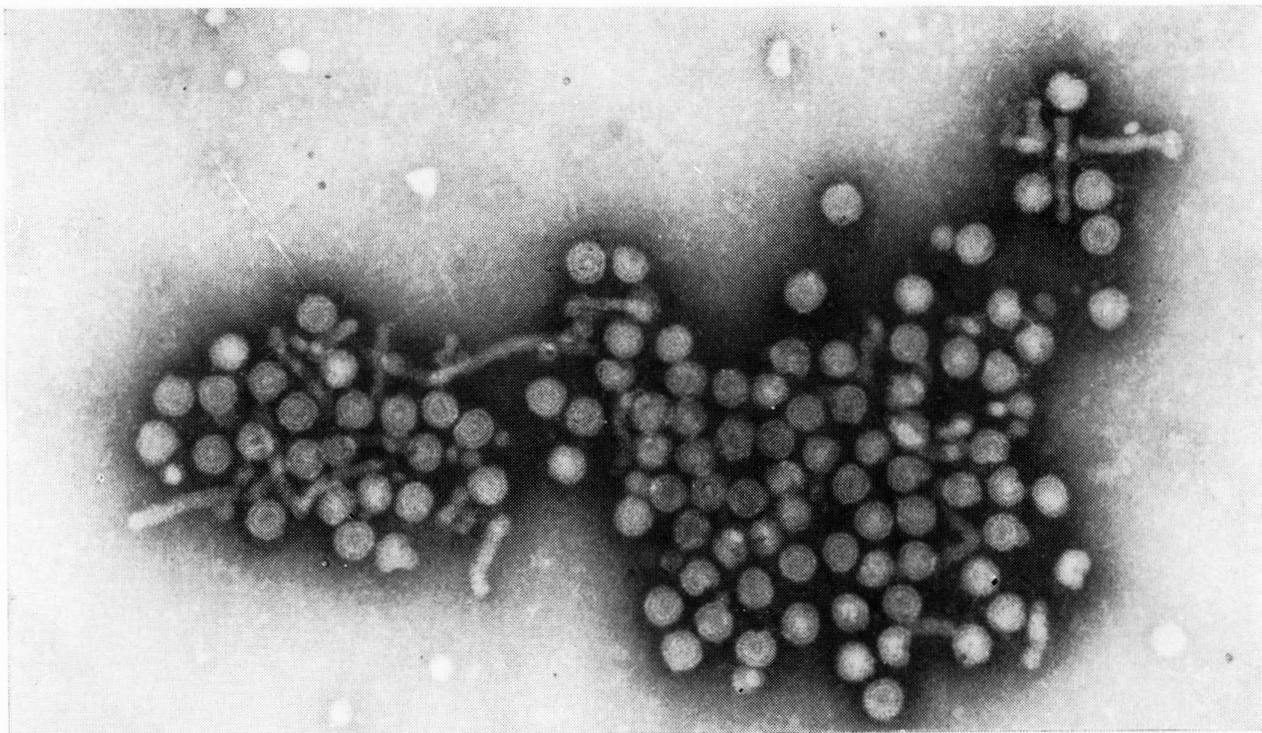
Obr. 1. Mimo jednu Daneovu částici zachyceny vláknité částice různé délky a malé částice. Zvětšení 155 700krát



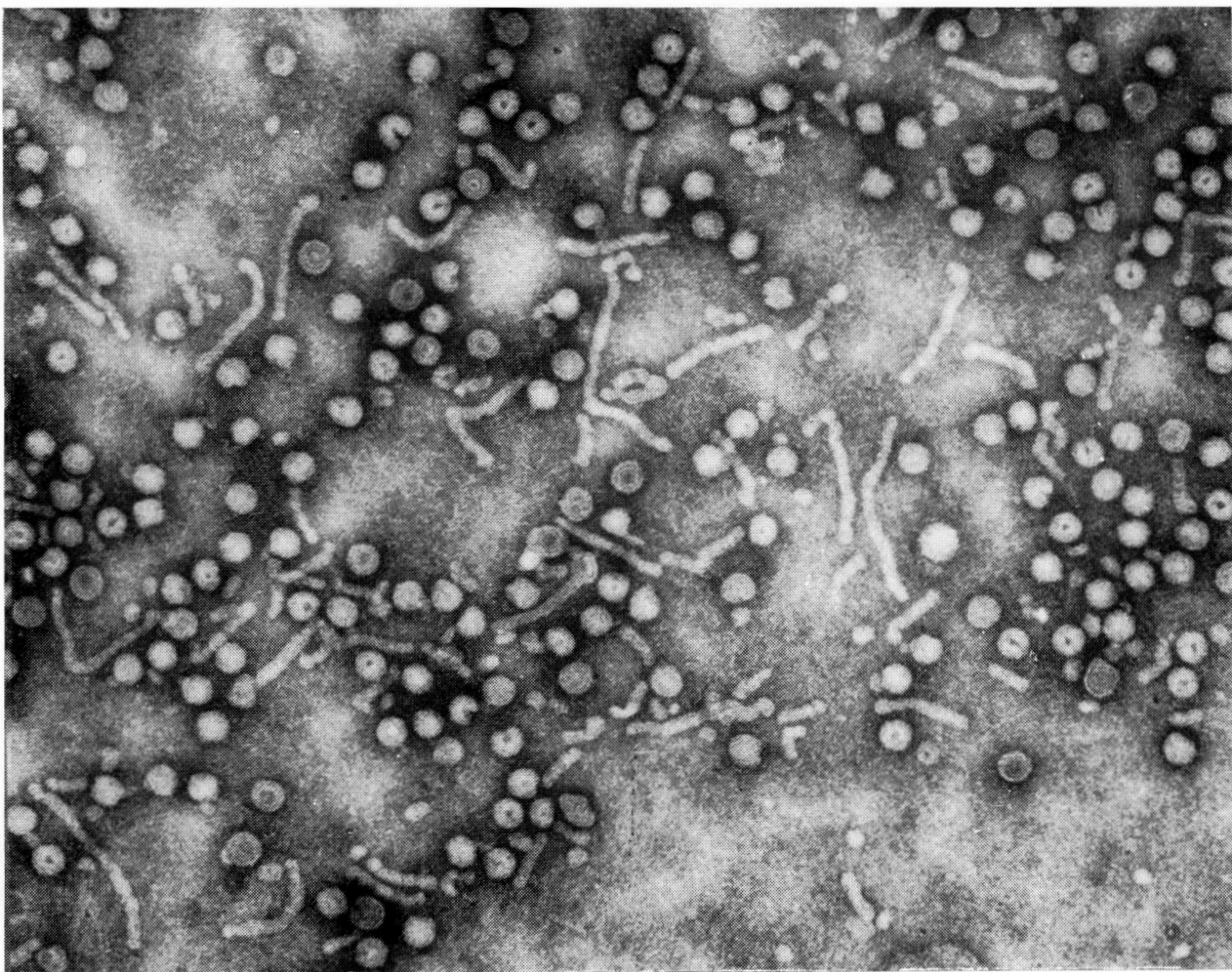
Obr. 2. Shluk všech tří morfologických forem HBsAg, resp. HBV, okrouhlé malé částice, vlákna a tři Daneovy částice s různě elektron-denzním vnitřkem. Zvětšení 155 700krát



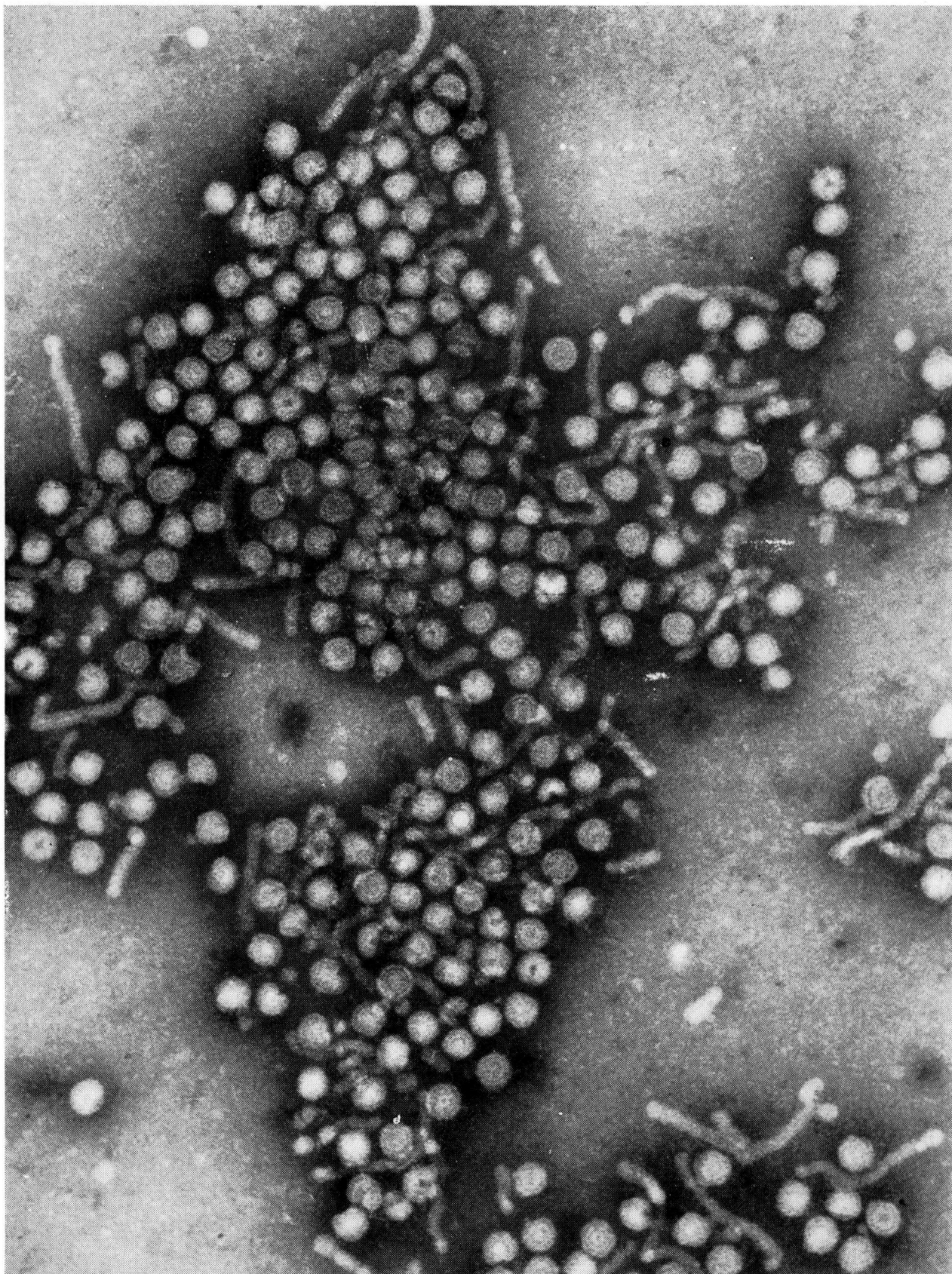
Obr. 3. Komplex částic detekovaný v séru pacienta bez přidaných specifických protilátek; je patrná naprostá převaha malých částic a jen málo vláken a Daneových částic. Zvětšení 91 000krát



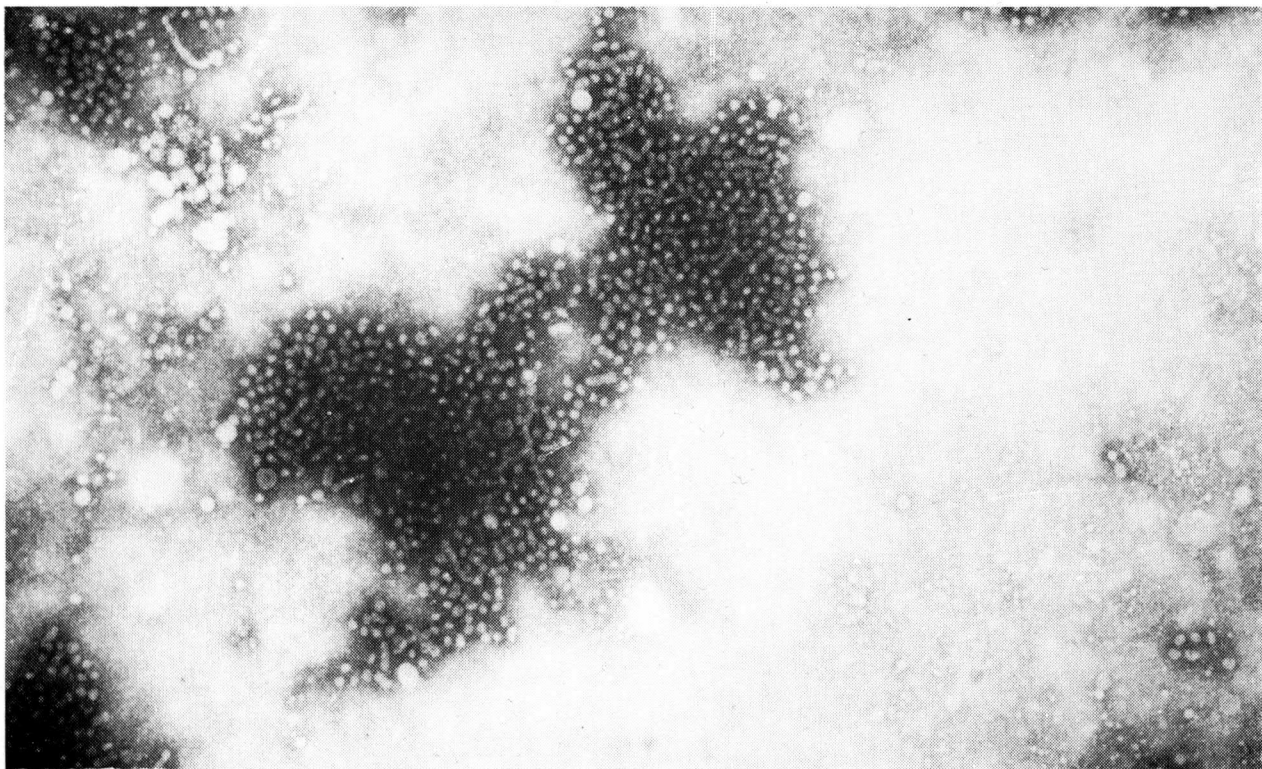
Obr. 4. Cirkulující imuno-komplex v séru pacienta složený téměř výhradně z Daneových částic. Ojediněle vidíme malé částice a vlákna. Zvětšení 119 000krát



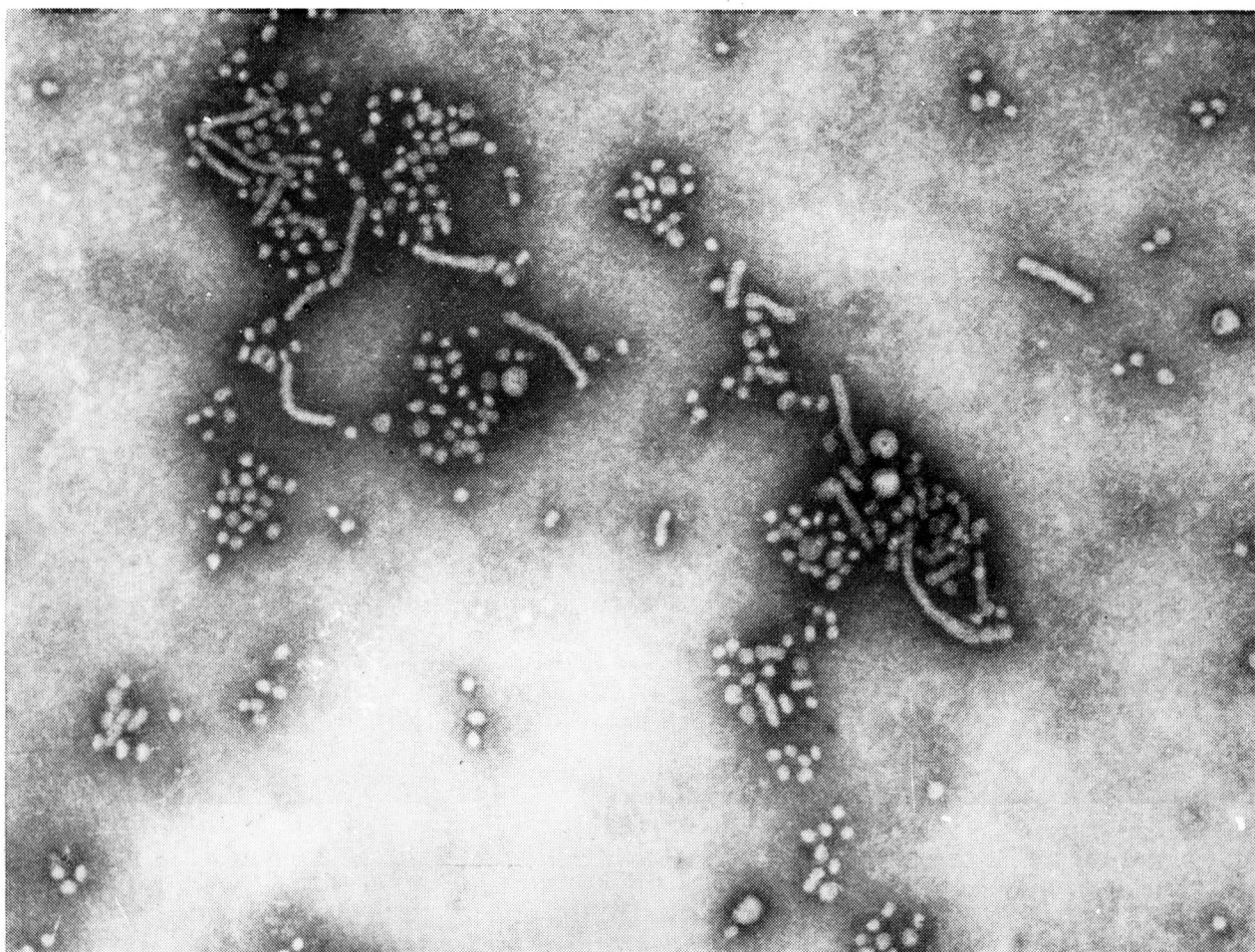
Obr. 5. Část séra pacienta bez přidaných protilátek, které obsahovalo obrovské množství Daneových částic a vláken. Na snímku můžeme vidět morfologické variace Daneových částic. Zvětšení 95 200krát



Obr. 6. Komplex Daneových částic a vláken, kde při větším zvětšení je dobře patrná ultrastruktura Daneových částic. Zvětšení 166 500krát



Obr 7. Uprostřed obrázku imuno-komplex, obsahující všechny morfologické formy HBsAg: nejpočetnější malé kulaté částice. Vpravo dole malý imuno-komplex složený pouze z malých částic, vlevo dole a nahoře části dalších imuno-komplexů. Zvětšení 67 600krát



Obr. 8. Všechny typy HBsAg detekované v séru s přidávanými protilátkami ve shlucích i jednotlivě, resp. v malých imuno-komplexech. Zde je dobře vidět pleomorfii malých částic. Zvětšení 91 000krát.

Vláknina byla též většinou solidní, jen někdy jsme viděli tmavý střed podél dlouhé osy. Na některých vláknách jsme pozorovali příčné žíhání ve vzdálenosti 3 nm (obr. 4). Výjimečně jsme nacházeli jeden konec vlákna ztlustělý nebo se rozšiřující až do průměru 50–70 nm; také jsme pozorovali konce vláken různě zkroucené nebo stočené do spirály. Vláknité formy HBsAg byly většinou rovné, někdy angulárního tvaru (obr. 2).

DČ byly převážnou většinou kulaté a uniformní svou vnitřní strukturou, i když nikoli barvitelností. Pravidelně jsme nacházeli různé elektron-denzní vnitřky DČ (obr. 2, 4, 5, 6). Jen výjimečně jsme našli DČ jakoby pučící nebo svinuté (obr. 5).

Velkým problémem při morfologickém vyhodnocení byly **nečistoty**. Pokud byly partikulárního charakteru určité velikosti, značně se i strukturou blížily morfologickým typům HBsAg, zejména malým částicím. Někdy bylo nečistot větší množství a mohly i překrývat jednotlivé částice nebo menší shluky. Dále jsme nacházeli různé krystaly a tuk, které ztěžovaly hledání částic HBsAg, resp. HBV. Někdy dokonce docházelo ke stavu, že síťka byla pokryta kontinuálně balastem a jen na malých polích tu byly vymezeny nahloučené částice HBsAg, takže by mohly být považovány za imuno-komplexy. Všechny podobné technické obtíže, s kterými jsme se setkali, jsou sebrány v práci Nováka a sp. (19).

Diskuse

Hlavním objektem našeho zájmu v předkládané práci je morfologie a struktura částic HBsAg, resp. HBV. Obecně lze shrnout, že jsme v EM zachytili u jednotlivých typů částic prakticky všechny variační nálezy popsané různými autory. Z nich jsou nejdůležitější priority připisány Bayerovi a sp. (5), Almeidaové a sp. (2, 4, 1), Daneovi a sp. (9), Desmyterovi a sp. (10), Hirschmanovi a sp. (13) a dalším.

Např. základní variace ve velikosti a skladbě malých částic a vláken, jak je popsala Almeida (1), je v současné době dobře známa, ale její význam není dosud uspokojivě vysvětlen (21). Příčné žíhání vláken v periodicitě 3 nm, jak jsme je popsali, je také už dokumentováno v knize Zuckermanově (23), podobně jako koncová ztlustění, stočení a angulárta vláken, avšak rovněž bez podrobnějšího vysvětlení. Nejdále se zřejmě dostali Hirschman a sp. (13), kteří popisují strukturální polymorfismus částic HBsAg v různých podmínkách iontové síly a pH, po působení peptidázy, nukleázy a organických denaturujících reagentů. Autoři vyslovují stanovisko, že morfologické variace HBsAg jsou závislé na interakcích mezi proteiny. Některé zde popsané strukturální změny se podobají našim nálezům, a tak se domníváme, že tzv. přirozené variace jsou výsledkem — aspoň zčásti —

zpracování materiálu, čistoty chemikálií, dodržování pH při barvení a možnosti odstranění balastu ze sér.

U DČ jsme mohli pozorovat protruze na povrchu, nepravidelné tvary či svinuté částice, podobně jako již uvedli ve své práci Desmyter a sp. (10). Je možné, že svinuté DČ imitují stočené tubulární formy HBsAg, nebo že jde o virové částice chemicky či fyzikálně porušené nebo zničené. Vcelku jsme však většinou nacházeli kulaté a velikostí i strukturou relativně uniformní DČ. Pokud se týká různých elektron-denzních vnitřků DČ, je naše pozorování v souladu s prací Kaplana a sp. (15) i jiných, kteří na základě separace těžších, tzv. plných, a lehčích, tzv. prázdných částic, v céziovém gradientu prokázali v prvních DNA-polymerázovou aktivitu a v druhých nikoli, pročež se domnívají, že jedny částice jsou infekční a druhé — inkompletní — jsou neinfekční.

Kvantitativní posuzování nálezů při imunní EM je podrobně diskutováno v našich předchozích sděleních (6, 19), kde se snažíme dát do vztahu tyto nálezy s charakterem a průběhem onemocnění. Až na výjimku týkající se hodnocení výskytu cirkulujících imuno-komplexů se v předkládané práci uvedené problematice vyhýbáme, neboť jde o studii morfologickou. Přesto stojí za komentář zkušenost získaná na rozsáhlém materiálu, že v imuno-komplexech vzniklých až in vitro (po přidání anti-HBs) se vyskytují podstatně menší podíly DČ nežli v cirkulujících imuno-komplexech. Podmíněnost této difference podílením se systémem e-antigenů s anti-e protilátkami na reakci in vivo (18) je vysoce pozoruhodná, avšak bez použití komplexní metodické výzbroje je pro nás zatím neanalyzovatelná. Toto chybí např. i v ostatní naší činnosti ve prospěch nemocných, jak lze odvodit z práce např. Wolfa a sp. (21), kteří korelovali nálezy DČ a imuno-komplexů s histologií a EM obrazy v játrech i s titrem a subtypem HBsAg. Zdá se nám však, že ani takto zkomplexněný metodický přístup nepřinese plně objektivní výsledky, nebudeme-li zahrnovat také imunologická a zejména pak buněčná vyšetření.

Souhrn

Séra pacientů s hepatitidou typu B (sérovou hepatitidou) v různé fázi onemocnění jsme bez přidání a s přidáním specifických protilátek vyšetřovali po negativním barvení v elektronovém mikroskopu. Sledovali jsme tentokrát hlavně strukturu částic antigenu hepatitidy B: 1) malých kulatých částic, 2) vláknitých částic a 3) větších kulatých Daneových částic; z těchto posledních některé představují infekční virióny hepatitidy B. Částice jsme detekovali jednotlivě i v komplexech a nalezené morfologické variace jsme konfrontovali s již popsanými nálezmi.

Literatura

1. Almeida, J. D.: Individual morphological variations seen in Australia antigen positive sera. *Am. J. Dis. Child.*, 123, 1972, s. 303—309.
2. Almeida, J. D. - Waterson, A. P.: Immune complexes in hepatitis. *Lancet*, II, 1969, s. 983—986.
3. Almeida, J. D. - Rubenstein, D. - Stott, E. J.: New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. *Lancet*, II, 1971, s. 1225—1227.
4. Almeida, J. D. - Zuckerman, A. J. - Taylor, P. E. - Waterson, A. P.: Immune electron microscopy of the Australia-SH [serum hepatitis] antigen. *Microbios*, 2, 1969, s. 117—123.
5. Bayer, M. E. - Blumberg, B. S. - Werner, B.: Particles associated with Australia antigen in sera of patients with leukemia Down's syndrome and hepatitis. *Nature*, 218, 1968, s. 1057—1059.
6. Benda, R. - Jelínková, A. - Novák, M. - Máchová, M. - Helm, R. - Stránský, J. - Jerie, M.: Diagnostika hepatitidy typu B elektronově mikroskopickým průkazem sérového korpuskulárního antigenu a jeho imunních komplexů. *Čas. Lék. čes.*, 116, 1977, s. 1483—1489.
7. Cossart, Y. E. - Field, A. M.: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen associated hepatitis. *Lancet*, I, 1970, s. 848.
8. Couleru, O. - Moulias, H. - Peter, F. - Bousquet, O. - German, A. - Loeper, J.: Étude ultrastructurale de l'antigène „Australie“. *Nouvelle Presse Méd.*, 2, 1973, s. 1633—1644.
9. Dane, D. S. - Cameron, C. H. - Briggs, M.: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, I, 1970, s. 695—698.
10. Desmyter, J. - Liu Wu Tse - Creemers, J.: The large particle of Australia antigen. *Am. J. Dis. Child.*, 123, 1972, s. 315—318.
11. Gust, I. D. - Cross, G. - Kaldor, J. - Ferris, A. A.: Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, I, 1970, s. 953.
12. Hirschman, R. J. - Shulman, N. R. - Barker, L. F. - Smith, K. O.: Virus-like particles in sera of patients with infectious and serum hepatitis. *J. Am. Med. Ass.*, 208, 1969, s. 1167—1170.
13. Hirschman, S. Z. - Schwartz, J. - Vernace, S. - Schaffner, F. - Ganz, C.: An electron microscopic study of the structural polymorphism of hepatitis B antigen. *J. Inf. Dis.*, 128, 1973, s. 605—617.
14. Jokelainen, P. T. - Krohn, K. - Prince, A. M. - Finlayson, N.D.C.: Electron microscopic observations on virus-like particles associated with SH antigen. *J. Virol.*, 6, 1970, s. 685—689.
15. Kaplan, P. M. - Ford, E. C. - Purcell, R. H. - Gerin, J. L.: Demonstration of subpopulations of Dane particles. *J. Virol.*, 17, 1976, s. 885—893.
16. Kelen, A. E. - Harthaway, A. E. - McLeod, D. A.: Rapid detection of Australia/SH antigen and antibody by a simple and sensitive technique of immunoelectron microscopy. *Canad. J. Microb.*, 17, 1971, s. 993—1000.
17. Lipman, M. B. - Hierholzer, W. J., Schleudenberg, A.: Isolation of cores from hepatitis B Dane particles. *J. Inf. Dis.*, 128, 1973, s. 664—667.
18. Neurath, A. R. - Trepo, C. - Chen, M. - Prince, A. M.: Identification of additional antigenic sites on Dane particles and the tubular forms of hepatitis B surface. *J. gen. Virol.*, 30 1976, s. 277—285.
19. Novák, M. - Benda, R. - Jelínková, A. - Máchová, M. - Helm, R.: Metodická problematika elektronově mikroskopického průkazu antigenu hepatitidy B a imunních komplexů s protilátkami k jeho povrchové složce. *Voj. zdrav. Listy*, 47, 1978, s. 31—39.
20. Stannard, L. M. - Polson, A. - Kipps, A. - Parker, J. R.: Two antigen-antibody systems in serum hepatitis: preparation of immunoglobulins and their reaction with Australia antigen and particles in liver cell homogenates. *Microbios*, 8, 1973, s. 87—100.
21. Wolf, I. L. - Jones, D. M. - Tapp, E. - Dymock, I. W.: Electron microscopy of serum of healthy hepatitis B antigen carriers. *J. Clin. Pathol.*, 28, 1975, s. 260—262.
22. Zuckerman, A. J.: Electron microscopy and immune electron microscopy. V: „Viral hepatitis and tests for Australia (hepatitis-associated) antigen and antibody.“ *Bull. W.H.O.*, 42, 1970, s. 975—977.
23. Zuckerman, A. J.: Human Viral Hepatitis. Hepatitis-associated antigen and viruses. North-Holland Publishing Company, 1975, s. 122—154.