

Bedeutung von anti-HBc-IgM für die Diagnose und Verlaufskontrolle der Hepatitis B: aktuelle Entwicklungen

The Diagnostic Significance and Prognostic Value of anti-HBc-IgM Determination for Hepatitis B: Recent Developments

B. Weber^{1,2,3} und H. W. Doerr¹

Zusammenfassung: Der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das Hepatitis B Virus (HBV) „core“ Protein wird für die Labordiagnose der akuten Hepatitis B sowie zur Verlaufskontrolle der chronischen HBV-Infektion eingesetzt. In letzter Zeit wurden sensitive Enzymimmunoassays (EIA) entwickelt, welche den Nachweis einer geringen anti-HBc-IgM-Aktivität im Serum (10 IU/ml) ermöglichen. Über eine quantitative Bestimmung von anti-HBc-IgM mit Hilfe dieser EIAs ist die Differenzierung einer akuten und chronischen Infektion bzw. einer HBV-Reaktivierung in über 90% der Fälle möglich. Neben dem Nachweis der viralen DNA stellt anti-HBc-IgM einen prognostischen Marker für den Verlauf und die Therapie der chronischen Hepatitis B dar. Allerdings wird die Korrelation zwischen anti-HBc-IgM und HBV-Replikation kontrovers diskutiert. Es empfiehlt sich deshalb, insbesondere zur Therapiekontrolle eine quantitative HBV-DNA- und HBsAg-Bestimmung sowie den qualitativen HBeAg-Nachweis in monatlichen Intervallen durchzuführen. Eine weitere Einsatzmöglichkeit der anti-HBc-IgM-Bestimmung ist die Abklärung ungewöhnlicher Befundkonstellationen wie zum Beispiel eine HBsAg-negative akute Hepatitis B oder isolierte anti-HBc-Seropositivität.

Schlüsselwörter: Hepatitis B-Antikörper/Serum; Hepatitis, Chronisch aktive/Diagnostik; Hepatitis B Core-Antigene/Immunologie; IgM/Immunologie; Interferon alpha.

Summary: Detection of IgM antibody against hepatitis B virus (HBV) core protein is used for laboratory diagnosis of acute hepatitis B and for follow-up of chronic hepatitis B. Actually, sensitive enzyme immunoassays (EIA) which permit the detection of low anti-HBc-IgM activity in serum (10 IU/ml) have been developed. Differentiation of acute from chronic in-

fection or HBV reaction is possible in more than 90% of the cases by quantitative detection of anti-HBc-IgM with these immunoassays. Anti-HBc-IgM and viral DNA detection are prognostic markers for therapy of chronic hepatitis B infection. Nevertheless, the correlation between anti-HBc-IgM and viral replication is still unclear. For therapy monitoring the performance of quantitative HBV DNA and HBsAg detection and qualitative HBeAg determination in monthly intervals should be recommended. A further application of anti-HBc-IgM detection is the resolution of unusual serological profiles, i.e. HBsAg negative acute hepatitis B or isolated anti-HBc seropositivity.

Keywords: Hepatitis B Antibodies/serum; Hepatitis B-Core-Antigens-immunology; Hepatitis, Chronic Active/diagnosis; IgM/immunology; Interferon alpha; Viremia-diagnosis.

Wie bei keinem anderen Infektionserreger steht bei dem Hepatitis B Virus (HBV) eine Vielfalt an serologischen Parametern zur Verfügung, welche in den meisten Fällen eine klare Aussage über das Stadium der Infektion, Virusreplikation und Infektiosität ermöglichen. Dennoch bleibt es etwas schwierig, bei einer chronischen Hepatitis B ein Aufflackern der Entzündungsaktivität differentialdiagnostisch von anderen infektiösen und nicht-infektiösen Ursachen abzugrenzen.

Neben der Quantifizierung der viralen Nukleinsäure über Hybridisierungsverfahren oder mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Bestimmung von HBeAg eine relativ zuverlässige Aussage über die Infektiosität eines Hepatitis B Virus-trägers. Wegen der einfachen Durchführbarkeit sowie der hohen Korrelation mit dem Aktivitätsgrad der HBV-Infektion nimmt auch die Titration von HBsAg neben der Quantifizierung der HBV-DNA einen besonderen Stellenwert als prognostischer Verlaufsmarker ein. Demgegenüber ist die klassische Methode der Infektionserologie, die quantitative Bestimmung erregerspezifischer IgM-Antikörper, etwas in den Hintergrund gerückt (1,2).

¹ Institut für Medizinische Virologie, Universitätskliniken Frankfurt

² Laboratoire Lieners et Hastert, Diekirch, Luxemburg

³ Korrespondenz-Adresse: Priv. Doz. Dr. Bernard Weber, Laboratoire Lieners et Hastert, 18, rue de l'Hôpital, L-9244 Diekirch, Luxemburg. Fax: +352 802605.

Eingegangen am 4. Mai 1996

Tabelle 1 Anti-HBc-IgM-Bestimmung mit konventionellen und neuen empfindlicheren Immunoassays im Vergleich

Testsystem	Konventioneller EIA	Quantitativer-EIA
Ergebnis	Nur qualitativ Positiver Nachweis (%)	Quantitativ
Akute HBV-Infektion	> 90	> 90
Chronische HBV-Infektion	15-50	> 90
Anti-HBc-positive Blutspender	< 1	5,6

In den letzten Jahren wurde jedoch die Bestimmung von anti-HBc-IgM in Bezug auf die Sensitivität und Quantifizierbarkeit durch den Einsatz von hochempfindlichen Enzymimmunoassays verbessert. Im folgenden werden die Einsatzmöglichkeiten der quantitativen Messung von anti-HBc-IgM für die Diagnose der akuten Infektion und als Verlaufsmarker der chronischen Hepatitis B unter Berücksichtigung aktueller Entwicklungen beschrieben.

Aktuelle Entwicklungen

Bis vor wenigen Jahren waren alle kommerzielle anti-HBc-IgM-Tests relativ unsensitiv eingestellt, um im allgemeinen nur hohe anti-HBc-IgM-Aktivitäten während der akuten Phase der Infektion und nicht niedrige Antikörperspiegel während einer chronischen Hepatitis B nachzuweisen. Die quantitative Bestimmung von anti-HBc-IgM mit den klassischen Festphasenimmunoassays wurde durch die Interferenz von Gesamt-IgM-Antikörpern beeinträchtigt [2].

Mit neueren kommerziellen Enzymimmunoassays (EIA) verschiedener Hersteller liegt die untere Nachweisgrenze bei 10 IU/ml. Mit diesen empfindlichen Tests ist über die quantitative Bestimmung von anti-HBc-IgM eine Differenzierung zwischen einer akuten und chronischen Infektion in über 90% der Fälle möglich [3]. Tabelle 1 zeigt die Bestimmung von anti-HBc-IgM mit konventionellen und den neueren sensitiveren und quantitativen EIAs im Vergleich.

Von Gerlich et al. [4] wurde ein cut-off-Wert von 600 IU vorgeschlagen, um eine akute von einer chronischen HBV-Infektion abzugrenzen. Brunetto et al. [5] legten dagegen einen Titer von 1/40.000 als Grenzwert fest.

Mit den neueren kommerziell erhältlichen EIAs sind IgM-Antikörper in geringen Konzentrationen bis zu 2 Jahre nach Ausheilen der Infektion und bei den meisten chronischen Trägern nachweisbar [6]. Mit den

herkömmlichen kommerziellen anti-HBc-IgM-Tests werden spezifische Antikörper nur bei 15% der Patienten mit einer chronischen Hepatitis beobachtet. Angeblich ist die kontinuierliche virale Replikation nicht in der Lage eine starke anti-HBc-IgM-Antwort aufrecht zu erhalten, welche charakteristisch für die akute Phase ist. Gelegentlich wird nach einer HBV-Reaktivierung, vor allem nach Steroid-Entzug, mit den konventionellen Tests eine anti-HBc-IgM-Antwort beobachtet [6].

Stellenwert von anti-HBc-IgM für die Diagnose der akuten und chronischen Hepatitis B

In bis zu 5% aller akuten HBV-Infektionen ist kein HBsAg nachweisbar. In diesen Fällen wird die Diagnose einer akuten Hepatitis über den Nachweis einer Virämie (Hybridisierung) und vor allem über die quantitative Bestimmung von anti-HBc-IgM gestellt.

Erhöhte Konzentrationen spezifischer IgM-Antikörper gegen das 27 nm „core“-Protein von HBV (anti-HBc-IgM) sind gewöhnlich zeitgleich zum Transaminasenanstieg im Serum nachweisbar [6]. Dieser Antikörper wird hochtitrig (> 1/10.000 bis 1/4.000.000) im Rahmen der Immunantwort auf die Synthese von viralem Nukleokapsid gebildet und spiegelt somit die angehende Virusreplikation wider. Der höchste Titer wird meistens in der 2. bis 3. Erkrankungswoche erreicht. Diese hohe anti-HBc-IgM-Aktivität geht unabhängig davon, ob die Infektion selbstlimitierend oder chronisch ist, zurück. Bei einer Reaktivierung von HBV ist anti-HBc-IgM allerdings wieder nachweisbar.

Bei 99% chronisch infizierter HBeAg-positiver Patienten sind IgM-Antikörper gegen das „core“-Antigen vorhanden [7]. Ursprünglich wurde vermutet, daß wie bei anderen viralen Infekten eine Abgrenzung von einer akuten und chronischen Hepatitis B über die Bestimmung von anti-HBc-IgM möglich ist [1]. Da aber auch bei einem großen Teil von chronisch infizierten Patienten anti-HBc-IgM im Serum vorhanden ist, ist eine Differenzierung über die qualitative Bestimmung dieses Parameters nicht möglich. Nach einer selbstlimitierenden Hepatitis B ist anti-HBc-IgM 3 bis 24 Monate später nachweisbar [1,7]. Bei 20% der

Nicht standardisierte Abkürzungen: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; EIA, enzyme immunoassay; HBc, Hepatitis B core antigen; HBeAg, Hepatitis B early antigen; HBsAg, Hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; PCR, polymerase chain reaction.

Patienten bleibt es sogar über 2 Jahre nachweisbar, obwohl weder eine Virusreplikation, noch eine chronische Lebererkrankung vorliegt. Die Ursache der anti-HBc-IgM-Persistenz bei durchgemachter HBV-Infektion bleibt bis zum heutigen Zeitpunkt ungeklärt. Es wird häufig beim Übergang zur chronischen Infektion nur eine schwache Abnahme und in einige Fällen ein Anstieg der anti-HBc-IgM-Titer beobachtet.

Ein negativer Serum-HBV-DNA-Test schließt eine chronische HBV-Infektion nicht aus

Trotz Vorliegen einer chronischen Hepatitis ist HBV-DNA nicht immer während des gesamten Krankheitsverlaufs im Serum nachweisbar [3]. Dies trifft besonders auf die Phase der Immunelimination zu, welche durch ein Aufflackern der entzündlichen Leberreaktion begleitet ist. Der Nachweis einer geringen anti-HBc-IgM-Konzentration (Titer zwischen 1/100 und 1/1000) spricht für eine aktive Immunantwort gegenüber HBV und stellt zu diesem Zeitpunkt den einzigen Hinweis für einen durch HBV induzierten Leberschaden dar (wenn es sich nicht um eine Restaktivität nach einer ausgeheilten akuten Hepatitis B handelt). Im Gegensatz dazu sind bei immuntoleranten Trägern ohne entzündliche Leberaktivität HBV-DNA und HBeAg in hohen Konzentrationen vorhanden, eine anti-HBc-IgM-Antwort bleibt aber aus. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß anti-HBc-IgM ein zuverlässiger Verlaufsparemeter der HBV-induzierten Lebererkrankung darstellt.

Nach Gerlich et al. [4] ist anti-HBc-IgM in niedrigen Titern bei 5,6% der gesunden Blutspender nachweisbar. Bei HBsAg-negativen und anti-HBc-positiven Blutspendern ist es sogar in 17,6% der Fälle vorhanden. Bei diesen Spendern, welche häufig an einer subklinischen Lebererkrankung leiden, weist die Anwesenheit von anti-HBc-IgM auf eine relativ frische inapparente Infektion hin und würde somit signifikant mehr potentiell infektiöse Blutspender als der sensitivste HBsAg-Test erfassen.

Verlaufsmarker der chronischen HBV-Infektion

Der Verlauf der chronischen HBV-Infektion ist sehr variabel. Neben Phasen mit relativ mildem klinischen Verlauf bzw. partieller Remission kommt es häufig zu Exazerbationen.

Meistens ist die Exazerbation einer chronischen Hepatitis B klinisch unauffällig [8]. In über 90% der Fälle kommt es zu einem Anstieg der HBV-DNA-Konzentration im Serum kurz bevor oder simultan zum Aufflackern der Leberenzyme, gefolgt von einer anti-HBc-IgM-Immunantwort.

Anti-HBc-IgM ist in jeder Form von *Lebererkrankung*, welche durch eine HBV-Infektion verursacht

wird, nachweisbar, unabhängig von der Dauer der Infektion und dem Ausmaß der Virusreplikation [9-11]. So spiegelt IgM-anti-HBc den durch die Immunantwort vermittelten Leberschaden wider.

Die niedrigsten Werte liegen bei milden Formen der chronischen Hepatitis B vor. Mittlere bis hohe Konzentrationen werden beim Aufflackern einer chronischen HBV-Infektion gemessen [6].

Zum Monitoring von Patienten mit einer chronischen Hepatitis B empfiehlt es sich deshalb, monatlich quantitative Bestimmungen von HBV-DNA, Leberenzymen und anti-HBc-IgM durchzuführen.

Bei der Quantifizierung von anti-HBc-IgM sollte berücksichtigt werden, daß eine Aussage über die Aktivität der HBV-Infektion nur im Verlauf bei einem Patienten möglich ist. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Patienten wird durch die unterschiedliche Affinität und Avidität der anti-HBc-IgM-Antikörper erschwert [3, 8, 12].

Prognostischer Marker der Interferon-Therapie

Bei HBeAg-positiven Patienten, welche auf eine Interferon- α -Therapie ansprechen, wird nach einem initialen Anstieg ein progressiver Rückgang der anti-HBc-IgM-Aktivität beobachtet. Nach 5-12 Monaten ist kein spezifisches IgM mehr bei virusfreien Patienten mit normalen Transaminasen vorhanden. Der ursprüngliche anti-HBc-IgM-Anstieg während der anti-HBe-Serokonversion deutet darauf hin, daß anti-HBc-IgM eine Rolle für die Eliminierung der infizierten Hepatozyten spielt [15]. IgM-Antikörper sind in der Lage Komplement zu binden und eine Komplement-abhängige Lyse der Zellen zu vermitteln.

Dagegen bleibt anti-HBc-IgM bei einer Reaktivierung der Hepatitis B auch nach vorübergehender Remission nachweisbar. Im Gegensatz zu histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen stellt die semiquantitative Bestimmung von anti-HBc-IgM im Serum einen einfachen und nichtinvasiven Test für die Verlaufsbeurteilung der chronischen Hepatitis B dar. Als prognostischer Marker stellt er eine sinnvolle Ergänzung zur HBV-DNA-Hybridisierung dar. Sowohl im Verlauf einer chronischen Hepatitis als auch unter einer Interferon-Therapie kann die Bestimmung der viralen DNA negativ ausfallen, um erst später bei einem Rückfall wieder positiv zu werden.

Allerdings wird die Korrelation zwischen anti-HBc-IgM und HBV-Replikation zur Zeit kontrovers diskutiert [13,14]. Der initiale Anstieg von anti-HBc-IgM korreliert nicht unbedingt mit einem Ansprechen der Interferon-Therapie. In einer Studie von Smith et al. [13] wurde dieses serologische Profil auch bei einem Non-Responder für die Interferon α -Therapie beobachtet. Es wurde keine Korrelation zwischen Virusreplikation und anti-HBc-IgM gefunden. Dagegen stimmten hohe anti-HBc-IgM-Titer mit der intrahepatischen Expression von HBeAg überein [5]. Bedingt

Tabelle 2 Ungewöhnliche und abklärungsbedürftige Serokonstellationen bei jetzt oder früher durchgemachter HBV-Infektion

- HBsAg positiv/ anti-HBc negativ
- HBsAg, anti-HBs und anti-HBc positiv
- Isoliert anti-HBc positiv
- HBeAg positiv/HBsAg negativ
- HBeAg und anti-HBe positiv
- Isoliert anti-HBs positiv bei nicht immunisierten Probanden

Tabelle 3 Ursachen für ein isoliert anti-HBc-positives Ergebnis

- Falsch positiver Befund
- Chronische Hepatitis B mit niedriger HBsAg-Konzentration (unter der Nachweisgrenze herkömmlicher EIAs)
- Passive Immunisierung (vertikale Übertragung von anti-HBc, Immunglobulingabe, Transfusion bzw. Behandlung mit Blutderivaten)
- Durchgemachte HBV-Infektion mit anti-HBs-Verlust
- Akute HBV-Infektion: Probenentnahme während des sogenannten diagnostischen Fensters, wenn HBsAg nicht mehr nachweisbar ist; in diesen Fällen ist meistens anti-HBe bereits vorhanden

durch die relativ starken Schwankungen der anti-HBc-IgM-Aktivität sowie die lange Halbwertszeit sollte deshalb anti-HBc-IgM nicht als alleiniger Verlaufsmarker der Interferon- α -Therapie eingesetzt werden.

Es ist weiterhin anzunehmen, daß neben der Virusreplikation die Konzentration von anti-HBc-IgM die Immunantwort gegenüber HBV widerspiegelt. Patienten mit einer chronischen Infektion mit hohen Virustitern und schwacher Immunantwort zeigen dementsprechend eine niedrige anti-HBc-IgM-Aktivität. Dagegen zeigen Patienten mit einer akuten und selbstlimitierenden HBV-Infektion höhere anti-HBc-IgM-Titer. In einer Studie von *Brunetto* et al. [5] wurden bei 97% der Patienten mit einer selbstlimitierenden akuten Hepatitis anti-HBc-IgM-Titer über 1/40.000 nachgewiesen. Bei chronischen Verläufen war IgM nur in 54% der Fälle und mit Titern unter 1/10.000 vorhanden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von *Sjögren* und *Hoofnagle* [7] waren aber auch 10% der gesunden HBV-Träger anti-HBc-IgM positiv, allerdings war am Ende des Beobachtungszeitraums kein anti-HBc-IgM mehr bei diesen Patienten vorhanden.

Abklärung ungewöhnlicher Befundkonstellationen

Das gleichzeitige Vorhandensein von anti-HBs und anti-HBc bei negativem HBsAg-Test spricht im allgemeinen für eine durchgemachte Infektion und Immu-

nität gegenüber einer Reinfektion. Ausnahmsweise wird diese Serokonstellation im Verlauf von akuten Hepatitiden beim Neugeborenen und bei fulminanten Hepatitiden, wenn die HBsAg-Expression durch das nekrotische Lebergewebe stark eingeschränkt ist, beobachtet. In solchen Fällen ist über die anti-HBc-IgM-Bestimmung eine Abgrenzung zwischen akuter und durchgemachter Infektion meistens möglich (Tabelle 2).

Eine weitere Einsatzmöglichkeit der anti-HBc-IgM-Bestimmung ist die Abklärung von isoliert anti-HBc-positiven Befunden. In Tabelle 3 sind die verschiedenen Möglichkeiten für diese Serokonstellation aufgeführt. Während des sogenannten diagnostischen Fensters in der Rekonvaleszenzphase ist der Nachweis von hochtitrigem anti-HBc-IgM beweisend für eine relativ frische HBV-Infektion. Diese Patienten werden trotz negativem HBsAg- und HBeAg-Nachweis als infektiös betrachtet, weil noch HBV in geringen Konzentrationen im Serum vorhanden sein kann.

Bei fehlendem anti-HBs und hochtitrigem anti-HBc-IgM ist eine Abgrenzung zwischen einer seltenen chronischen Hepatitis B mit negativem HBsAg und einer durchgemachten Infektion mit Verlust der anti-HBs-Reaktivität meistens nicht möglich. Der Nachweis von anti-HBe in Verbindung mit einem hohen Titer von anti-HBc spricht für eine chronische Infektion. Zur Abklärung dieser Fälle wird die Bestimmung von HBV-DNA mit Hilfe der PCR herangezogen.

Bei einer Koinfektion oder Superinfektion mit HCV kommt es zu einer Interferenz mit der Replikation von HBV, so daß bei diesen Patienten gehäuft isolierter anti-HBc-positive Befunde beobachtet werden [15].

Das Vorhandensein von anti-HBc-IgM stellt einen Hinweis für die virale Replikation dar, auch wenn diese so gering ist, daß HBV-DNA oder eine Polymerase-Aktivität im Serum nicht nachweisbar ist. Dagegen korreliert anti-HBc-IgM nicht unbedingt mit HBeAg. Bei HBeAg-negativen Patienten mit klinischen, biochemischen und histologischen Zeichen einer chronischen Hepatitis B ist anti-HBc-IgM im Serum vorhanden, auch wenn vorübergehend nur geringe Konzentrationen von HBV-DNA in der Hybridisierungsreaktion nachweisbar sind. In dieser Hinsicht ist die Bestimmung von anti-HBc-IgM besonders sinnvoll bei prä-„core“-Mutationen; hier kommt es im Verlauf einer chronischen Hepatitis zu einem Aufflackern der Infektion nach einer anti-HBe-Serokonversion mit häufig intermittierendem Nachweis viraler Nukleinsäure [16].

Schlußfolgerungen/ Resumée

Die quantitative Bestimmung von anti-HBc-IgM mit hochsensitiven Immunoassays stellt zweifellos eine Verbesserung der serologischen Diagnostik der Hepatitis B dar. Neben der approximativen Differenzierung zwischen einer akuten und chronischen bzw. durchgemachten Infektion stellt anti-HBc-IgM einen prognos-

stischen Marker für den Verlauf und die Therapie der Hepatitis dar. Allerdings wird die Korrelation zwischen anti-HBc-IgM und HBV-Replikation kontrovers diskutiert. Es empfiehlt sich deshalb, insbesondere zur Therapiekontrolle quantitative Bestimmungen von HBV-DNA und HBeAg in monatlichen Intervallen durchzuführen. Bei isoliert anti-HBc-positiven Befunden, welche häufig bei HCV-Ko- bzw. Superinfektionen und bei AIDS-Patienten beobachtet werden, ermöglicht die Bestimmung von anti-HBc-IgM in den meisten Fällen eine Abgrenzung zwischen einer aktiven bzw. durchgemachten HBV-Infektion.

Literatur

1. Gmelin K, Theilmann L, Hasche G, Will H, Czygan P, Doerr HW, Kommerell B. Anti-HBc IgM bei akuter und chronischer Hepatitis-B-Virus-Infektion. *Klin Wochenschr* 1984;62: 837-42.
2. Hasche G, Stecher J, Gmelin K, Doerr HW. Use of hepatitis B core antigen produced in *Escherichia coli* to detect immunoglobulin M specific antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Microbiol* 1984;3:30-4.
3. Brunetto MR, Cerenzia MT, Oliveri F, Piantino P, Randone A, Calvo PL, Rocca G, Galli C, Bonino F. Monitoring the natural course and response to therapy of chronic hepatitis B with an semi-quantitative assay for IgM anti-HBc. *J Hepatol* 1993;19:431-6.
4. Gerlich WH, Uy A, Lambrecht F, Thomssen R. Cut-off levels of IgM antibody against viral core antigen for differentiation of acute chronic and past hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol* 1986;24:288-93.
5. Brunetto MR, Arrigoni A, Toti M, Almi P, Zanetti A, Ferroni P, Doris R, Aneloni V, Crovari P, Coppola RC, Bonino F. The diagnostic significance of IgM antibody to hepatitis B core antigen: revisited. *Ital J Gastroenterol* 1988;20:167-70.
6. Hollinger FB. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology Third Edition*, Lippincott-Raven, 1996:2739-2807.
7. Sjogren M, Hoofnagle JH. Immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen in patients with chronic type B hepatitis. *Gastroenterol* 1985;89:252-8.
8. Mels GC, Bellati G, Leandro G, Brunetto MR, Vicari O, Borzio M, Piantino P, Fornaciari G, Scudeller G, Angelli G, Bonino F, Ideo G. Fluctuations in viremia, aminotransferases and IgM antibody to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B patients with disease exacerbations. *Liver* 1994;14:175-81.
9. Banninger P, Altorfer J, Frösner G, Pirovino M, Gudat F, Bianchi L, Grob PJ, Schmid M. Prevalence and significance of anti-HBc IgM (radioimmunoassay) in acute and chronic hepatitis B and in blood donors. *Hepatology* 1983;3:337-42.
10. Bonino F, Brunetto MR. Hepatitis B virus heterogeneity, one of many factors influencing the severity of hepatitis B. *J Hepatol* 1993;18:5-8.
11. Koike K, Lino K, Kurai K, Mitamura K, Endo Y, Oka H. IgM anti-HBc in anti-Hbe positive chronic type B hepatitis with acute exacerbations. *Hepatology* 1987;7:573-6.
12. Levy P, Marcellin P, Martinot-Peignoux M, Degott C, Nataf J, Benhamou JP. Clinical course of spontaneous reactivation of hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1990;12:570-4.
13. Smith HM, Lau JYN, Davies SE, Daniels HM, Alexander GJM, Williams R. Significance of serum IgM anti-HBc in chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 1992;36:16-20.
14. Surrenti C, Ambu S, Patussi V, Milani S, Casini A, Zacchi P, Ceccatelli P, Cefaratti C, D'Agata A. Diagnostic significance of anti-HBc IgM (RIA) in healthy HBsAg carriers and in chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1986;18:229-34.
15. Mimms LT, Mosley JW, Hollinger FB. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection. *Br Med J* 1993;307:1095-7.
16. Carman WF, Fagan EA, Hadziyannis S. Association of a pre-core genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1991;14:219-22.