

Aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Nephrologie und Internistische Intensivmedizin (CVK/CCM)  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Prävalenz okkultter Hepatitis B Infektionen  
bei chronischen Hämodialyse- und  
nierentransplantierten Patienten**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sunda Jasmin Rimpler

aus Krummhörn

Datum der Promotion: 13.12.2019

# Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Seema Baid-Agrawal, Ralf Schindler, Petra Reinke, Adrienne Staedtler, Sunda Rimpler, Barbara Malik, Ulrich Frei, Thomas Berg, **Prevalence of occult hepatitis C infection in chronic hemodialysis and kidney transplant patients**, Journal of Hepatology, 60(5), 2014, S. 928-933

Marion Muche, Thomas Berg, Sunda Rimpler, Adrienne Staedtler, Stefan Böhm, Peter Nickel, Seema Baid-Agrawal, **Low prevalence of occult hepatitis B virus infection in chronic haemodialysis and kidney transplant patients**, Liver International, 2019, 39, S. 263-270

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	9
1. Abstrakt .....	10
2. Einleitung.....	12
3. Wissenschaftlicher Hintergrund.....	13
3.1. Virushepatitis.....	13
3.2. Hepatitis B.....	13
3.2.1. Erreger.....	13
3.2.2. Koinfektionen mit Hepatitis D und Hepatitis C Virus.....	15
3.2.3. Epidemiologie .....	15
3.2.4. Übertragung.....	16
3.2.5. Immunprophylaxe .....	17
3.2.6. Klinik und Verlauf.....	18
3.2.7. Akute Hepatitis B Infektion.....	18
3.2.8. Chronische Hepatitis B Infektion.....	19
3.2.9. Okkulte Hepatitis B Infektionen.....	20
3.2.10. Diagnostik der HBV Infektion.....	21
3.2.11. Diagnostik der okkulten HBV Infektion .....	24
3.2.12. Hepatitis B Infektionen bei Hämodialyse-Patienten.....	24
3.2.13. Hepatitis B Infektionen bei Nierentransplantierten Patienten .....	27
3.2.14. Okkulte Hepatitis B Infektionen bei chronischen Hämodialyse- und Nierentransplantierten- Patienten .....	27

4.	Zielsetzung der Arbeit.....	29
5.	Material und Methoden.....	31
5.1.	Studiendesign .....	31
5.2.	Patienten .....	31
5.3.	Positiv-Kontrollen .....	31
5.4.	Negativ-Kontrollen.....	31
5.5.	Studienablauf .....	32
5.6.	Citrat- oder EDTA-Blut .....	35
5.7.	Probengewinnung .....	35
5.8.	Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen.....	35
5.9.	Diagnostik der HBV Infektion .....	36
5.9.1.	Serologische Diagnostik .....	36
5.9.2.	Molekularbiologische Diagnostik .....	38
5.10.	Statistische Auswertung.....	38
6.	Ergebnisse.....	40
6.1.	Dialysepatienten.....	40
6.1.1.	Demografisch und klinisch.....	40
6.1.2.	Prävalenz OBI bei Dialysepatienten .....	41
6.2.	Nierentransplantierte.....	43
6.2.1.	Demografisch und klinisch.....	43
6.2.2.	Prävalenz OBI bei Nierentransplantierten .....	44
6.3.	Positiv-Kontrollen .....	47
6.4.	Negativ-Kontrollen.....	47
7.	Diskussion .....	48

7.1. Relevanz der Studie.....	48
7.2. Entwicklung der OBI.....	48
7.3. Beurteilung der angewandten Diagnostik/ Methodik.....	49
7.4. Beurteilung des Untersuchungsmaterials .....	50
7.5. Beurteilung der Prävalenz von 0,24 %.....	50
7.6. Beurteilung des Parameters anti-HBc.....	51
7.7. Auswahl des Endemiegebietes .....	51
7.8. Auswahl des Patientenkollektivs .....	52
7.9. Auswahl des Antikoagulanzen .....	53
7.10. Relevanz genetischer und epigenetischer Faktoren .....	53
7.11. Vorteile und Limitationen der Studie .....	54
7.12. Schlussfolgerungen.....	54
8. Literaturverzeichnis .....	55
9. Eidesstattliche Versicherung .....	67
9.1. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....	68
10. Lebenslauf.....	69
11. Publikationsliste.....	71
12. Danksagung .....	72

## Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
Anti-HBc	Hepatitis B core Antikörper
Anti-HBc-IgM	Hepatitis B core Immunglobulin M
Anti-HBc-IgG	Hepatitis B core Immunglobulin G
Anti-HBs	Hepatitis B surface Antikörper
AST	Aspartat-Aminotransferase
cccDNA	Covalently closed circular DNA
CHD	Chronic hemodialysis
CMIA	Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay
CMV	Zytomegalievirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco´s Phosphate-Buffered Saline
EASL	European Association for the Study of the Liver
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$\gamma$ -GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HBV	Hepatitis B Virus
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B envelope Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HLA	Humane Leukozytenantigen
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KTxR	Kidney transplant recipients
LHBs	L-Protein
MHBs	M-Protein
OBI	Occult hepatitis B virus infection
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
rcDNA	relaxed circular DNA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rHBcAg	Rekombinantes Hepatitis B core Antigen
RLE	Relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Realtime-polymerase chain reaction
SHBs	S-Protein
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organisation

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung I: Weltweite Prävalenz von Hepatitis B (26) .....	16
Abbildung II: Akute und chronische Hepatitis B Verläufe (34).....	20
Abbildung III: Verlauf HBV-Serologie (43).....	22
Abbildung IV: Standardnachweis HBV Infektion vs. Nachweis okkulte HBV Infektion ...	24
Abbildung V: Beispiel des Fragebogens .....	34
Abbildung VI: Demografische und klinische Parameter der untersuchten Dialysepatienten (N=376) .....	40
Abbildung VII: Prävalenz okkulten Hepatitis B Infektionen bei Dialysepatienten .....	42
Abbildung VIII: Demografische und klinische Parameter der untersuchten nierentransplantierten Patienten (N=417) .....	43
Abbildung IX: Prävalenz von okkulten Hepatitis B Infektionen bei Nierentransplantationspatienten.....	45
Abbildung X: Langzeit-Follow-up des OBI Patienten (mit anti-HBs Titer, ALT Nachweis und HBV Viruslast) (60).....	47

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle I: Hepatitis B Virus serologische und virologische Marker (15) .....	23
Tabelle II: Prävalenz der Hepatitis B unter Dialysepatienten (46).....	26

# 1. Abstrakt

**Einleitung:** Okkulte Hepatitis B Infektionen (OBI) werden definiert als die Präsenz von Hepatitis B Virus (HBV) DNA im Serum und/ oder in Hepatozyten in HBsAg-negativen Patienten. Die Prävalenz und klinische Relevanz der OBI bei Hämodialyse Patienten und Nierentransplantierten sind bisher ungeklärt, deshalb wurden sie in dieser großen Querschnittsstudie untersucht. Da es Hinweise darauf gibt, dass HBV sich auch in extrahepatischen Zellen befindet, wurden zusätzlich periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) als Untersuchungsmaterial verwendet.

**Methodik:** Bei 417 Hämodialyse Patienten, 417 Nierentransplantierten, 20 HBsAg-positive nicht-Hämodialyse und nicht-Nierentransplantierte Patienten (positiv Kontrolle) und 40 HBsAg-negativ gesunde Freiwilligen (negativ Kontrolle) wurde Serum und PBMCs mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf HBV DNA untersucht.

**Ergebnisse:** Hämodialyse Patienten: 41/417 wurden aufgrund fehlender anti-HBc oder HBV DNA-Bestimmung aus der Studie ausgeschlossen. 2/376 Patienten waren HBsAg-positive. Die 374 HBsAg-negativen Patienten wurden negativ auf HBV-DNA im Serum und PBMCs getestet. Nierentransplantierte Patienten: 14/417 Patienten waren HBsAg-positiv. 1/417 HBsAg-negativ Patienten wurden positiv auf HBV DNA im Serum aber nicht in PBMCs getestet. Positiv Kontrollen: 6/20 Patienten befanden sich unter antiviraler Therapie und es wurde keine HBV-DNA im Serum und PBMCs nachgewiesen. In 11/14 Patienten, die HBsAg-positiv waren, wurde HBV-DNA im Serum, und in 3/11 im Serum und PBMCs nachgewiesen. Negativ Kontrollen: Bei 6/40 konnte anti-HBc nicht bestimmt werden. Alle verbleibenden 34 Patienten waren anti-HBc-negativ und HBV-DNA-negativ im Serum und PBMCs. In der Langzeituntersuchung zeigte der einzige anti-HBc-negative Patient mit OBI einen Verlust von anti-HBs nach 5 Jahren Studienaufnahme und eine HBV Reaktivierung mit HBsAg Re-Serokonversion.

**Schlussfolgerungen:** Es wurde keine Prävalenz von OBI bei Hämodialyse Patienten und eine sehr niedrige Prävalenz von unter 1% bei Nierentransplantierten nachgewiesen, so dass die Routine-Diagnostik und Screening von HBV-DNA mittels PCR in diesem Patientenkollektiv und der ausgewählten Region nicht nötig ist. Bei Nierentransplantierten sollte jedoch ein Screening auf HBV DNA vor Transplantation erfolgen. Die Untersuchung von HBV-DNA in PBMCs scheint keinen Vorteil zu haben.

**Introduction:** Occult hepatitis B virus infection (OBI) is defined as presence of hepatitis B virus (HBV)-DNA in serum and/or liver in HBsAg-negative patients. We investigated the prevalence of OBI in large chronic hemodialysis (CHD) and kidney transplant recipients (KTxR) cohorts, including determination of HBV-DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

**Methods:** HBV-DNA was determined with the PCR in both serum and PBMCs in 417 CHD patients, 417 KTxR, 20 HBsAg-positive non-CHD non-KTx patients (positive controls) and 40 HBsAg-negative healthy subjects (negative controls).

**Results:** CHD group: 41/417 were excluded because of missing results in anti-HBc or HBV DNA. 2/376 patients were HBsAg-positive. The 374 HBsAg-negative patients were tested negative for HBV-DNA in both serum and PBMCs. KTxR group: 14/417 patients were HBsAg-positive. 1/417 HBsAg-negative patients were tested positive for HBV DNA in serum but not in PBMCs. Positive controls: 6/20 patients were under antiviral therapy and had negative HBV-DNA in both serum and PBMCs. In 11/14 remaining patients, HBV-DNA was detected in serum, and in both serum and PBMCs in 3 patients. Negative controls: In 6/40 were missing results of anti-HBc, all remaining 34 patients were anti-HBc-negative and HBV-DNA-negative in both serum and PBMCs. In the long-term, the only case of anti-HBc-negative OBI lost anti-HBs five years after inclusion in the study and showed HBV reactivation with HBsAg re-seroconversion.

**Conclusions:** We found nil prevalence of OBI in CHD patients and a very low prevalence (<1%) in KTx recipients suggesting that testing of HBV-DNA is not required for screening and diagnosis in these populations in our region. However, in KTxR, pretransplant screening with HBV DNA should be considered. Testing for HBV-DNA in PBMCs does not seem to be of additional value.

*Einige Formulierungen sind dem Abstract "Low prevalence of occult hepatitis B virus infection in chronic haemodialysis and kidney transplant patients" entommen (s.u. Publikationen).*

## 2. Einleitung

Infektionen mit dem Hepatitis B Virus (HBV) sind weltweit ein großes gesundheitliches Problem, welches mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität einhergeht (1). Besonders bei Patienten im Endstadium einer terminalen Niereninsuffizienz spielen Hepatitis Infektionen eine wichtige Rolle (2), da sie durch Bluttransfusionen und nosokomiale Übertragungswege einem höheren Ansteckungsrisiko ausgesetzt sind. Trotz des Hepatitis-Screenings bei Bluttransfusionen und Transplantaten, der verminderten Verwendung von Bluttransfusionen durch den Einsatz von Erythropoetin und der Entwicklung von Hygienestandards, ist das Vorkommen von HBV Infektionen bei Dialysepatienten und somit auch bei nierentransplantierten Patienten wesentlich höher als in der Allgemeinbevölkerung (3). Obwohl die momentan erhältlichen Standardtests für HBV Infektionen, die virus-spezifische Antikörper, zirkulierende virale Antigene oder virales HBV-Genom nachweisen, ausreichend etablierte Methoden sind, besitzen sie eine zu niedrige Sensitivität für Hämodialyse- und Nierentransplantierte Patienten, die unter einem supprimierten Immunsystem leiden (4) (5).

Okkulte HBV Infektionen (OBI), die in verschiedenen Studien beschrieben wurden, stellen eine zusätzliche Problematik dar (6). OBI werden definiert als die Anwesenheit von HBV-DNA im Serum und/oder in den Leberzellen bei gleichzeitiger Abwesenheit von HBsAg im Serum des Patienten. Dieser Befund wurde zum ersten Mal in einer Studie von 1985 bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen beschrieben (7). Sie stellen eine große Herausforderung an das Gesundheitssystem, da es unter anderem noch keine standardisierte Screeningtests gibt. Außerdem ist das Risiko der Ansteckungsgefahr bei Transplantationen und Transfusionen unklar und auch die Rolle bei Entwicklungen von hepatozellulären Karzinomen wird diskutiert (8). Es gibt bisher jedoch wenig Erkenntnisse hierzu, die diese Entität der OBI explizit bei Hämodialyse und Organtransplantierten Patienten beschreiben.

Es gibt Hinweise darauf, dass das Virusgenom nicht nur in Hepatozyten, sondern auch in extrahepatischen Zellen persistieren kann (9). In einer früheren Studie wurden 67 Hämodialyse Patienten auf Hepatitis B-DNA und C- RNA in periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) untersucht. In 9% der Patienten konnte Virus DNA ohne weitere serologische Marker im Serum nachgewiesen werden (6). Die Etablierung eines hochsensitiven

Suchtest nach HBV DNA mittels PCR, um OBI aufzudecken, ist somit von hoher klinischer Relevanz.

## **3. Wissenschaftlicher Hintergrund**

### **3.1. Virushepatitis**

Die Virushepatitis äußert sich durch eine Leberentzündung, die durch eine Infektion mit einem hepatotropen Virus verursacht wird. Es zeigen sich akute und chronische Krankheitsverläufe, die vom Genotyp, vom Wirt und von Umwelteinflüssen beeinflusst werden. Bislang wurden 9 verschiedene Genotypen (A–I) beschrieben (10).

### **3.2. Hepatitis B**

#### **3.2.1. Erreger**

Das humane HBV gehört zur Familie der Hepadnaviridae (11). Die Besonderheiten der Hepadnaviren bestehen in einem ausgeprägten Hepatotropismus, hoher Spezies-Spezifität, einer besonderen Genomorganisation, einem Replikationsmechanismus über eine reverse Transkription und in der Fähigkeit, eine chronisch-persistierende Infektion auszubilden (12).

HBV ist im Gegensatz zu allen anderen Hepatitisviren ein DNA-Virus. Das Genom besteht aus einer zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA, die über ein RNA-Intermediat mithilfe einer reversen Transkriptase synthetisiert wird (13). Der DNA-Minusstrang des Genoms hat eine Länge von ca. 3200 Basenpaaren, an deren Ende eine Polymerase gebunden ist. Der zugehörige DNA-Plusstrang ist wesentlich kürzer. Durch die kleine Genomgröße besitzen alle Nukleotide eine codierende Funktion. HBV-Polymerase besitzt eine reverse Transkriptase-Aktivität, die den DNA-Minusstrang synthetisiert. Die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität synthetisiert dann wiederum den kürzeren DNA-Plusstrang des Genoms. Dieser Bereich der reversen Transkriptase im Protein weist Ähnlichkeiten mit der HIV-Polymerase auf. Mutationen in diesem Bereich führen zu Resistenzen gegen Nukleosid-Analoga (14).

Das ikosaedrisch aufgebaute Viruskapsid, in dem sich die DNA befindet, ist durch Core-Proteine (HBcAg) aufgebaut. Die lösliche Form des HBc-Antigens wird von infizierten Leberzellen sezerniert und HBe-Antigen genannt. Das HBeAg hat eine immunmodulatorische Funktion und wird für die Chronifizierung der HBV Infektion verantwortlich gemacht. Die Virushülle besteht aus lipidhaltigen Hepatitis B Oberflächenantigenen HBsAg (Hepatitis B surface antigen), die für den serologischen Nachweis einer akuten oder chronischen Infektion von Bedeutung sind. Diese Oberflächenproteine sind das kleine S-Protein (SHBs), das mittlere M-Protein (MHBs oder PräS2-Protein) und das große L-Protein (LHBs oder PräS1-Protein) (15). Für die Bildung und Infektiosität von weiteren Viren sind die Oberflächenantigene L und S notwendig. Als Zielzellen von HBV gelten die Hepatozyten (16). Für die Bindung an die Hepatozyten wird das Oberflächenprotein L (LHBs) benötigt. Anschließend wird das virale Genom in den Hepatozyten repliziert, indem zunächst die rcDNA (offene DNA-Form) in die cccDNA (kovalent geschlossene Form) synthetisiert wird. Die cccDNA ist ein sogenanntes Minichromosom und baut sich nicht in das Wirtsgenom ein. Im Zellkern liegend ist es für Medikamente schwer zugänglich. Nach erfolgter Replikation und Virusassemblierung werden die reifen Nukleokapside von der Leberzelle sezerniert (14).

Das HBV ist nicht zytopathogen, sondern – so wie alle viralen Hepatitiden – eine immunologisch vermittelte Erkrankung. Die Zellschädigung entsteht durch Virus-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten und T-Helferzellen. CD8<sup>+</sup>-zytotoxische T-Zellen erkennen die auf den Hepatozyten durch HLA-Moleküle präsentierten HBV-Proteine und aktivieren somit die Viruselimination (17).

Interferon-alpha bewirkt als Mechanismus der natürlichen Immunität zunächst die Hemmung der viralen Replikation, die Zerstörung der Virus-DNA und die Aktivierung der natürlichen Killerzellen (18) (19). Zeitgleich werden durch freigesetzte Viren und deren Bestandteile dendritische Zellen aktiviert. Anschließend folgt die HBV-spezifische Immunantwort, die durch die dendritischen Zellen in der Leber, die in die Lymphknoten wandern, hervorgerufen wird, indem sie zytotoxische T-Lymphozyten, T-Helferzellen und B-Zellen stimulieren. Die T-Zellen bekämpfen das HB-Virus mittels Zytolyse infizierter Leberzellen und Freisetzung von Interferon-alpha und TNF alpha. Durch die natürliche und adaptive Immunantwort kommt es idealerweise zu einer effektiven multispezifischen Zellantwort der zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Helferzellen und zur spontanen Ausheilung einer akuten Hepatitis B Infektion. Das Virus kann jedoch im Körper persistieren und unter

anderem bei einer Organspende den Empfänger unter immunsupprimierender Therapie infizieren. Neben den Hepatozyten werden auch PBMC wie Lymphozyten und Monozyten infiziert (14).

### **3.2.2. Koinfektionen mit Hepatitis D und Hepatitis C Virus**

Eine wichtige Rolle spielen Koinfektionen mit anderen viralen Erregern. Besonders hervorzuheben sind Infektionen mit Hepatitis D und C. Da sich das Hepatitis D Virus (HDV) nicht ohne die Oberflächenproteine des Hepatitis B Virus vermehren kann, findet sich bei einer Hepatitis D Infektion auch immer eine Hepatitis B Infektion (20). Eine akute HDV Infektion zeigt häufiger schwere Verläufe. Die Chronifizierung verläuft ungünstiger, indem sich wesentlich schneller Leberzirrhosen und -karzinome entwickeln. Die Mortalität und Morbidität gegenüber der alleinigen HBV Infektion erhöht sich (21). Aus diesem Grunde sollte bei einer HBV Infektion auch immer der HDV-Antikörper-Suchtest durchgeführt und dementsprechend die antivirale Therapie angepasst werden, wobei bisher nur Therapieversuche mit Interferon-alpha teilweise zum erwünschten Erfolg führten.

Eine weitere relevante Koinfektion ist mit Hepatitis C Virus (HCV). Der Infektionsweg ist oftmals derselbe, sodass eine HBV-HCV-Koinfektion mit 10–20 % nicht selten ist. Eine Infektion mit diesen drei viralen Erregern nimmt einen schwereren Verlauf der Hepatitis und ergibt ein höheres Risiko zur Entwicklung eines HCC. Das Risiko einer Leberzirrhose liegt sogar bei 80% (22). Auch sollte vor Beginn einer antiviralen Therapie gegen Hepatitis C eine Hepatitis B Infektion ausgeschlossen werden, da es sonst zu einer Reaktivierung mit fulminantem Verlauf kommen kann. Okkulte HBV Infektionen sind oftmals bei Patienten mit chronischer Hepatitis C nachgewiesen worden (23), außerdem beeinflussen sie zusätzlich das Therapieansprechen einer HCV Infektion negativ (14).

### **3.2.3. Epidemiologie**

Hepatitis B ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit (24). Laut Angaben der WHO aus dem Jahre 2015 haben ca. 2 Milliarden Menschen eine HBV Infektion oder diese durchgemacht. Weltweit sind 257 Millionen Menschen an einer chronischen Hepatitis B Infektion erkrankt, jedoch nur 9 % der Infizierten wissen von ihrer Diagnose. Ein noch geringerer Anteil von ca. 1,7 Millionen erhält eine medikamentöse Therapie. Ein besonders hohes Vorkommen von ca. 5–10 % chronischen HBV Infektionen findet man

in Afrika, Ostasien, Ost- und Zentraleuropa und im Amazonasgebiet. Im mittleren Osten und auf dem indischen Subkontinent sind ca. 2–5 % der Bevölkerung betroffen. Die Prävalenz von chronischen Infektionen liegt in Westeuropa, Nord-Amerika und Latein-Amerika bei unter 2 %. Eine chronische HBV Infektion kann eine Leberzirrhose oder ein Leberzellkarzinom verursachen. In diesem Zusammenhang treten laut WHO weltweit ca. 887 000 Todesfälle jährlich auf. HBV wird für 45 % der hepatozellulären Karzinome und 30 % der Leberzirrhosen verantwortlich gemacht (25).

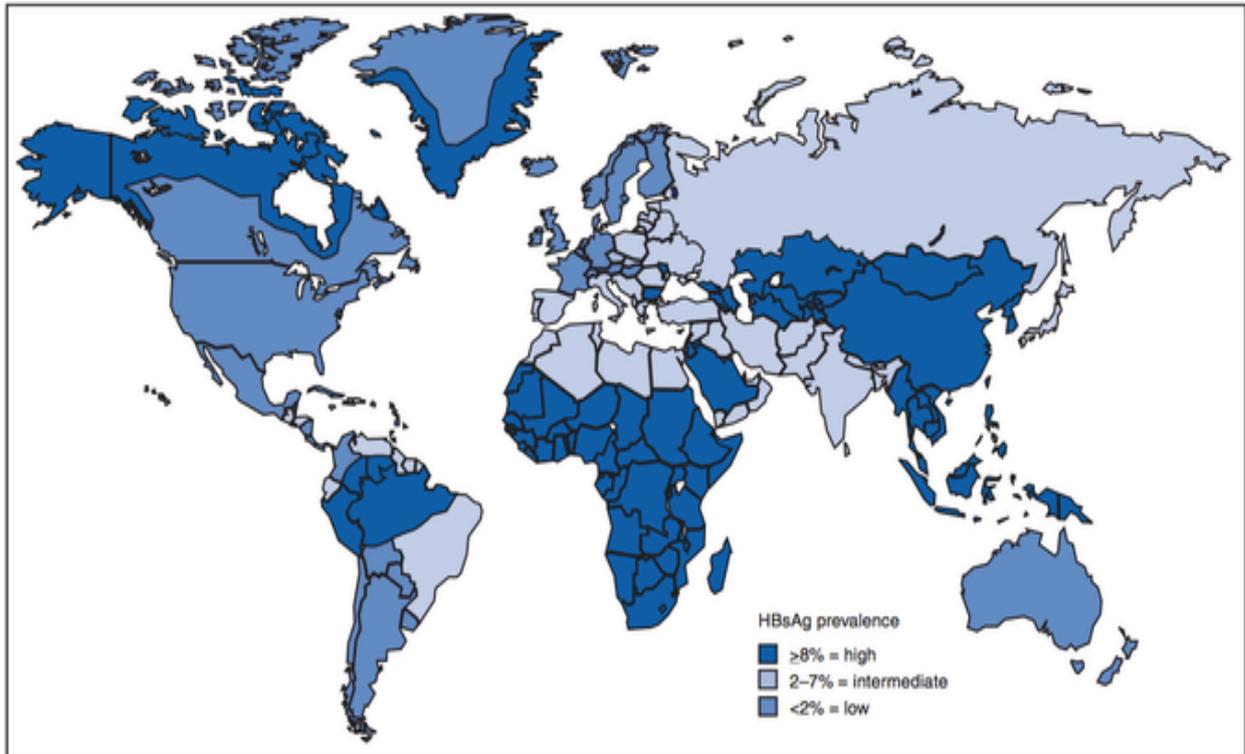


Abbildung I: Weltweite Prävalenz von Hepatitis B (26)

### 3.2.4. Übertragung

Der Infektionsweg erfolgt parenteral durch Blut bzw. Blutprodukte, Körperflüssigkeiten, kontaminierte Instrumente, sexuell und perinatal (27). Ein hohes Risiko findet man vor allem bei der sexuellen Übertragung, und hier insbesondere bei Männern, die entweder a) Sex mit Männern haben, b) Prostitution ausgesetzt sind oder c) Sextourismus betreiben (28) (29). Das Transmissionsrisiko durch Blut und Blutprodukte spielte vor 1970 eine sehr große Rolle, konnte jedoch durch HBsAg- und später anti-HBc-Screeningverfahren soweit minimiert werden, dass in Westeuropa nur noch ein geringes Restrisiko besteht.

In Ländern mit krankenhaushygienischen Defiziten bleibt die Problematik jedoch bestehen. Eine weitere Risikogruppe sind i.v.-Drogenkonsumenten (30). In dieser Personengruppe kommt es durch kontaminierte Spritzen und Kanülen oft zusätzlich zu Koinfektionen mit übertragbaren Erkrankungen wie Hepatitis C und HIV Infektionen. Laut WHO liegt das höchste Infektionsrisiko mit HBV in vielen Ländern weltweit bei der perinatalen Übertragung. Die Infektion bei Neugeborenen führt in 90 % der Fälle zu einer chronischen HBV Infektion. Eine weitere Infektionsquelle ist die häusliche Umgebung, wenn man in einem gemeinsamen Haushalt mit HBV Infizierten lebt (31) (25).

### **3.2.5. Immunprophylaxe**

Die HBV Impfung wird zur Primärprophylaxe der HBV Infektion angewendet. HBs-Antikörper binden dabei an die viralen Oberflächenmoleküle und neutralisieren diese (32). Der Antigen-Antikörper-Komplex wird anschließend von Makrophagen aufgenommen und lysiert. Bei passiven Impfungen werden HBs-Antikörper eines gesunden Spenders direkt injiziert; bei der aktiven Impfung injiziert man dagegen HBs-Antigene, die eine T- und B-Zellaktivierung mit anschließender Antikörper-Bildung auslösen. Die passive Impfung wird meistens nur als Postexpositionsprophylaxe angewendet und kann eine aktive Immunisierung nicht ersetzen. Der Impfstoff zur aktiven Immunisierung wird rekombinant in Hefekulturen hergestellt und in drei Einzeldosen zur Grundimmunisierung appliziert. Ca. 90–95 % der immunkompetenten geimpften Personen entwickeln protektive Antikörper-Titer. Der Titer bei Patienten mit HIV, Dialysepflichtigen, Organtransplantierten und Patienten unter immunsuppressiver Therapie sollte jedoch überprüft werden, da es hier zu einer geringeren Impfantwort kommen kann. Bei einem Serumspiegel  $< 10$  U/l gilt man als Non-Responder. Eine erneute Grundimmunisierung führt in 40–60 % der Fälle zu dem gewünschten Impferfolg.

Die Inzidenz des Auftretens einer akuten Hepatitis B konnte durch Einführung der Impfung signifikant gesenkt werden (33). Die WHO empfiehlt seit 1996 ein generelles Impfprogramm bei Kleinkindern, welches zu einer erheblichen Senkung der Infektionsraten führte.

Eine besondere Stellung nehmen Patienten nach einer Lebertransplantation ein, die an einer HBV-assoziierten Leberzirrhose litten. Nach der Transplantation ist die passive Immunisierung in Kombination mit einer antiviralen medikamentösen Therapie nötig, da es in 80 % der Fälle zu einer Reaktivierung des HBV-Genoms kommen kann.

Für Hämodialyse-Patienten gilt durch die Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe ebenso ein gesondertes Verfahren. Da die protektive Serokonversionsrate durch ein geschwächtes Immunsystem mit 40–60 % deutlich erniedrigt ist, wird die Impfung vor Eintreten der Dialysepflicht mit erhöhten Einzeldosen empfohlen (14).

Laut dem globalen Hepatitis-Report erhalten immerhin 84 % der geimpften Person die dritte Impfung, die die Grundimmunisierung abschließt. Weltweit bekommen 39 % der Neugeborenen eine Impfung, wobei Nordamerika und die westliche Pazifik-Region die breiteste Abdeckung aufweisen (34).

Laut WHO haben 185 der 194 Mitgliederstaaten die HBV Impfung in die Impfempfehlungen mitaufgenommen. Weitere 9 Staaten benutzen einen Zeitplan für eine spätere Impfung oder für Risikogruppen (34).

### **3.2.6. Klinik und Verlauf**

Die HBV Infektion verläuft sehr unterschiedlich, da es interindividuelle Variationen im Immunsystem, vor allem bei den HLA-Molekülen und T-Zellen gibt. Auch Virustyp, Koinfektionen und weitere wirtseigene Faktoren nehmen Einfluss auf den Verlauf.

### **3.2.7. Akute Hepatitis-B-Infektion**

Etwa ein Drittel der infizierten Personen entwickeln eine klinisch manifeste, ikterische, akute Hepatitis. Bei zwei Drittel der Infizierten ist der Verlauf anikterisch und oftmals sogar asymptomatisch. Nur bei etwa 1 % kommt es zu einem fulminanten Verlauf mit Leberversagen und einer hohen Letalität. Über 90 % der akuten Hepatitis-Erkrankungen heilen bei immunkompetenten Personen ohne Folgen aus. Serologisch lässt sich bei diesen Patienten anti-HBc nachweisen. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass das Virusgenom zu geringen Anteilen weiter in den Hepatozyten und PBMC persistiert (14).

### 3.2.8. Chronische Hepatitis B Infektion

Eine HBsAg-Persistenz im Serum über 6 Monate und klinische sowie laborchemische Nachweise einer Hepatitis definieren einen chronischen Verlauf der Hepatitis B Infektion (35). Es werden laut den EASL Guidelines für Hepatitis B 5 verschiedene Verlaufsformen unterschieden, wobei vor allem die Infektion oder Leberentzündung eine entscheidende Rolle spielt. Wegweisend sind außerdem die Marker HBeAg, HBV DNA Viruslast, Alanin Aminotransferase (ALT) und der histologische Befund der Leber. HBV-Träger mit HBeAg-negativem Nachweis, normalen bis erhöhten Transaminasen und HBV DNA Viruslast sowie eindeutige Zeichen einer Leberentzündung zeigen ein erhöhtes Leberzirrhose-Risiko. Nach einer perinatalen Infektion entwickelt sich typischerweise die bisher beschriebene immuntolerante, replikative Hepatitis B mit positivem HBeAg-Nachweis. Es zeigt sich laborchemisch nur eine geringe Transaminasenerhöhung, jedoch eine hohe HBV DNA Replikationsrate von über  $10^7$  Kopien/ml, was auf eine hohe Kanzerogenität hinweisen kann. Der histologische Befund ist jedoch meistens unauffällig. Nach etwa 10–30 Jahren und vor allem bei Infektionen im Erwachsenenalter kann diese Verlaufsform in die immunaktive, replikative HBeAg-positive Hepatitis B übergehen. Neben der deutlichen Transaminasen-Erhöhung, der hohen HBV-DNA-Replikationsrate von über  $10^5$  Kopien/ml zeigt sich vor allem eine histologische Veränderung der Hepatozyten. Bei einer Inzidenz von 8–20 % in 5 Jahren erhöhen sich das Risiko einer Leberzirrhose und das damit einhergehende Risiko, ein Leberzellkarzinom auszubilden. Eine weitere Verlaufsform ist die immunaktive, replikative HBeAg-negative Hepatitis B. Sie zeichnet sich durch abwechselnd erhöhte und niedrige Transaminasen und geringere HBV DNA Replikation aus. Entgegen früheren Meinungen hat diese Verlaufsform keine schlechtere Prognose gegenüber der HBeAg-positiven Hepatitis, da die histologischen Veränderungen oftmals gering sind.

HBsAg-negative Träger mit anti-HBc positivem Nachweis und manchmal auch Antikörpern gegen HBsAg mit normalen Transaminasen-Werten und Nachweis HBV DNA beschreiben die okkulte HBV Infektion (10) (14). Diese besondere Form ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird später ausführlicher diskutiert.

Weltweit sind laut WHO hauptsächlich Neugeborene und Kinder, die sich im Kleinkindalter infizieren, von der chronischen Hepatitis B betroffen. Im Erwachsenenalter entwickeln nur 5 % der Betroffenen eine chronische Verlaufsform der Infektion; dagegen sind es bei

Neugeborenen 90 % und bei Kleinkindern 20–60 %. Wird die Hepatitis B Erkrankung nicht ausreichend therapiert besteht ein 8–20 % erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Leberzirrhose und im weiteren Verlauf eine Inzidenz von 1–5 % für hepatozelluläre Karzinome (25). Laut einer Studie aus Taiwan steigt das Risiko bei positivem HBsAg- und HBeAg-Nachweis sogar auf über 60 % an (17).

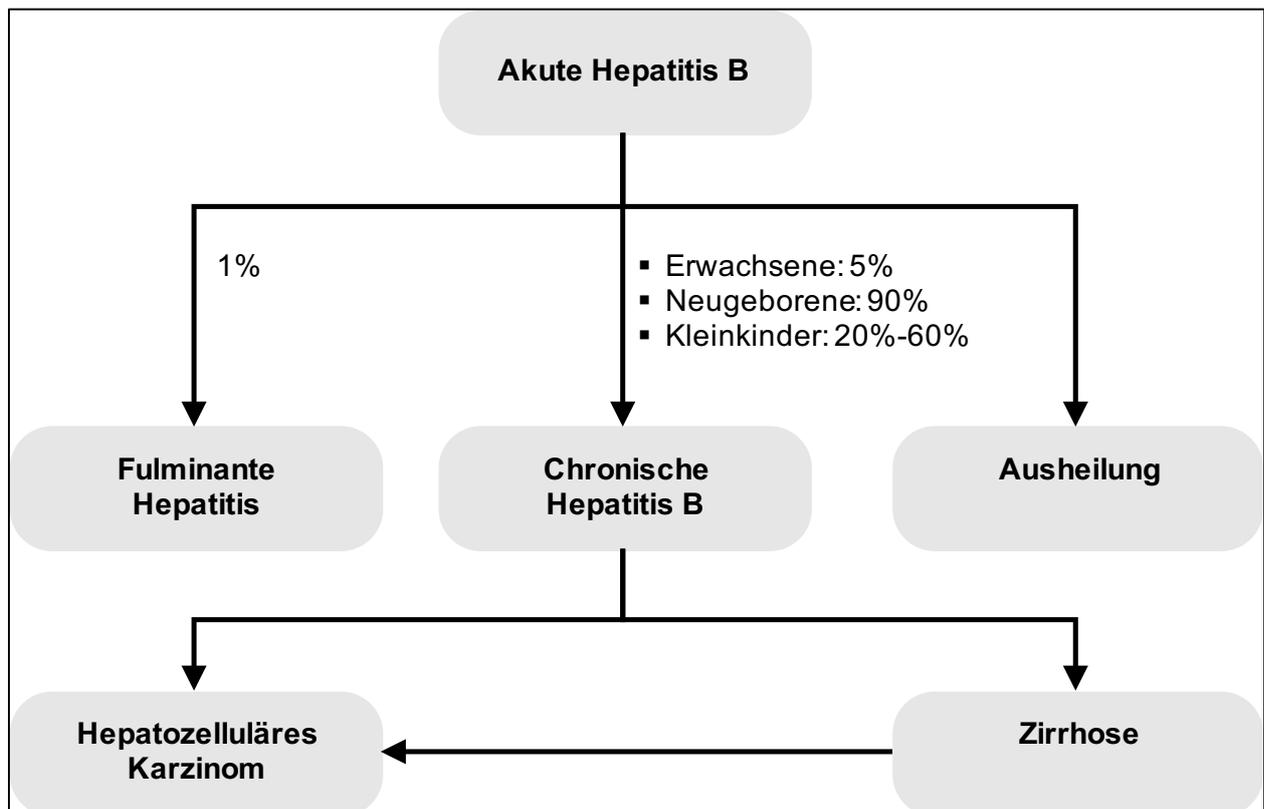


Abbildung II: Akute und chronische Hepatitis B Verläufe (34)

### 3.2.9. Okkulte Hepatitis B Infektionen

Neben einer akuten und chronischen Hepatitis B Infektion gibt es OBI. Wie bereits beschrieben, werden OBI als die Anwesenheit von HBV DNA im Serum und/oder in den Leberzellen bei gleichzeitiger Abwesenheit von HBsAg im Serum des Patienten definiert.

Es wird davon ausgegangen, dass die HBsAg-Negativität durch das Immunsystem, eine hohe Unterdrückung der DNA-Replikation, Co-Infektionen wie HIV und HCV und epigenetische Faktoren beeinflusst wird (36).

OBI bleiben klinisch und laborchemisch unentdeckt und können so über Jahrzehnte persistieren. Sie wurden bisher nicht nur bei Patienten nachgewiesen, die eine akute oder

chronische HBV Infektion durchgemacht haben, sondern auch bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom, Hämodialyse Patienten und HCV Infizierten (37).

Der Nachweis der HBV DNA hat sich als schwierig erwiesen, da sie sich meistens aufgrund erniedrigter Replikationsraten unterhalb der Nachweisgrenze befindet (38) und somit standardisierte Tests nicht ausreichen. Es muss eine hochempfindliche PCR angewandt werden, um die DNA im Serum, Hepatozyten oder PBMCs nachzuweisen.

Obwohl die Replikationsrate erniedrigt ist, kann es trotzdem über die Jahre zu histologischen Leberveränderungen kommen, die die Grundlage zur HCC-Entwicklung geben. Außerdem kann die OBI in eine akute Hepatitis übergehen, wenn es im Träger zu einer immunsupprimierenden Situation kommt. Dies macht die OBI auch zu einer großen Ansteckungsgefahr bei Organtransplantationen, bei denen sich der Empfänger unwissentlich mit dem Virus infiziert.

### **3.2.10. Diagnostik der HBV Infektion**

Zur Diagnostik der HBV Infektion gehören laborchemische Parameter, die Hepatitis-Serologie und die HBV DNA-Analyse. Eine wichtige Rolle in der Serumuntersuchung spielen die Transaminasen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT/AST), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT/ALT) und Gamma-Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT). Zur Einschätzung des Schweregrades der Leberzirrhose dient hierbei  $\gamma$ -GT, wenn andere lebertoxischen Ursachen ausgeschlossen werden konnten. GPT ist bei einer Hepatitis meist höher als GOT; die Transaminasen-Erhöhung kann jedoch auch vollkommen ausbleiben oder zu unterschiedlichen Zeiten erhöhte oder normale Werte zeigen (39).

Zur Bestimmung der Hepatitis-Serologie gehört HBsAg, das bereits 1–10 Wochen nach Infektion nachweisbar ist. Kann HBsAg länger als 6 Monate nachgewiesen werden, liegt eine chronische Hepatitis B Infektion vor (40). Aufgrund HBsAg-Mutationen und in der Infektions-Frühphase können jedoch falsch negative Werte getestet werden. Bei der okkulten HBV Infektion ist der Träger HBsAg negativ; es lässt sich jedoch HBV DNA im Blut nachweisen.

Ein weiterer serologischer Parameter ist der anti-HBs-Antikörper. Der Nachweis von anti-HBs-Ak ohne Anwesenheit von HBsAg spricht für eine Ausheilung und sogenannte HBs-Serokonversion. Nach einer Impfung sind nur anti-HBs-Ak im Serum vorhanden. Sind

zeitgleich auch anti-HBc-Antikörper nachweisbar, so spricht das für eine abgelaufene Infektion, die sogenannte Seronarbe. Dies sind Antikörper gegen das Core-Protein (HBcAg), die selbst nur in den Leberzellen nachweisbar sind. Anti-HBc-Antikörper werden bei jeder HBV Infektion ausgebildet und können manchmal der einzige Hinweis für eine Infektion sein. Das HBeAg ist dem HBcAg genetisch ähnlich; es besitzt aber eine zusätzliche Präcore-Region, die ein Protein mit 29 Aminosäuren codiert. Durch posttranslationelles Trunkierung am N-Terminus und Carboxy-Terminus entsteht das lösliche HBeAg (41), das die Prognose des Verlaufs beeinflusst. Bei der HBeAg-negativen-Hepatitis B liegt eine Stop-Mutation vor, sodass die Translation nicht stattfinden kann. Niedrige HBeAg-Titer sprechen für ein erfolgreiches Therapieansprechen mit Interferon, während hohe Titer auf eine erhöhte Infektiosität und, bei einer Chronifizierung, das Risiko für Leberzirrhose erhöhen (40). Treten anschließend anti-HBe-Antikörper auf, so kommt es zu einer Normalisierung der Leberwerte, HBV DNA-Suppression und HBeAg-Verlust, der sogenannten HBe-Serokonversion. Eine replikative Hepatitis B kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden (42).

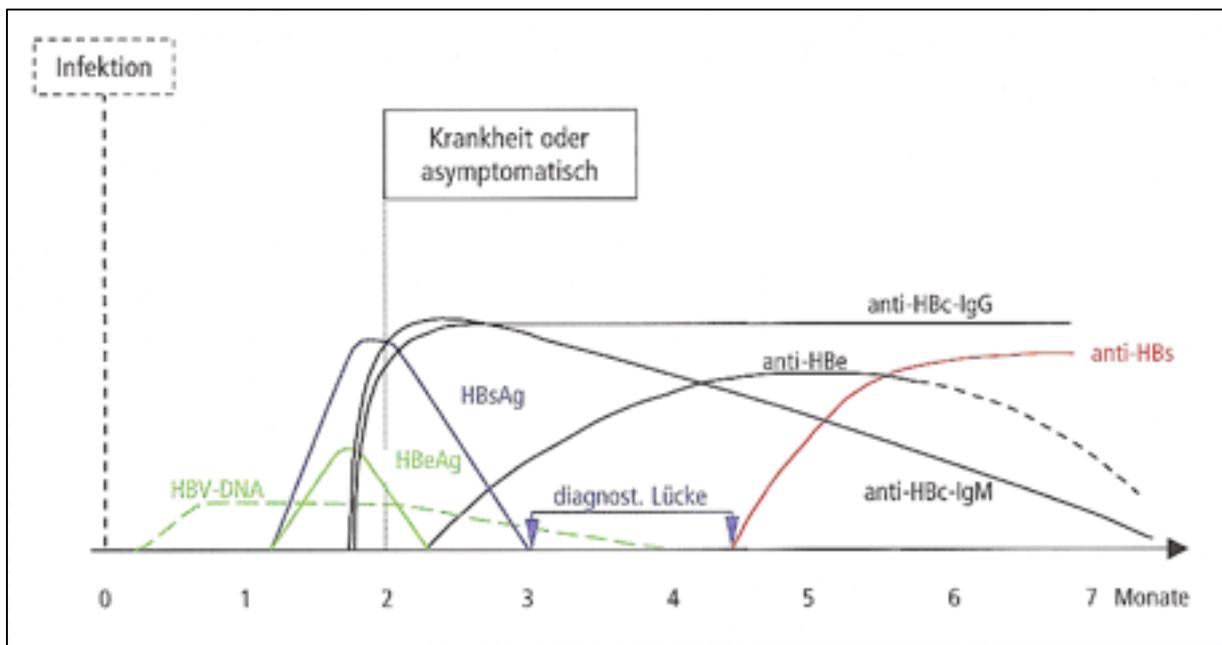


Abbildung III: Verlauf HBV-Serologie (43)

Die HBV DNA-Bestimmung erfolgt entweder durch Signalamplifikations-Assays oder Targetamplifikations-Assays (z. B. PCR). Bei der Signalamplifikation wird ein DNA-Strang,

der mit einem Farbstoff oder Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, mit einem komplementären DNA-Strang hybridisiert und somit sichtbar gemacht. Dieses Testverfahren besitzt keine hohe Sensitivität, jedoch eine gute Reproduzierbarkeit. Bei der Polymerasekettenreaktion wird die DNA durch Hitze zunächst denaturiert, und anschließend wird ein spezifischer Primer hybridisiert. Eine thermostabile Taq-Polymerase führt nun die Elongation aus. Der entstandene DNA-Doppelstrang wird erneut denaturiert, und der Zyklus beginnt von Neuem. Dieses Testverfahren bietet eine hohe Sensitivität (44). Laut dem Robert-Koch-Institut wurde 2015 eine neue Falldefinition eingeführt, die besagt, dass nur noch der direkte HBV Virus-Nachweis mit den serologischen Markern HBsAg und HBeAg als beweisend für eine Infektion gilt. Somit reicht es nicht mehr aus, den serologischen Marker anti-HBc nachzuweisen (31).

▪ HBsAg	▪ HBV Infektion, akut und chronisch
▪ HBeAg	▪ Hohe HBV Replikation und Infektiosität; Marker für Therapieerfolg
▪ HBV DNA	▪ Level für HBV Replikation; primäre virologische Marker für Therapieerfolg
▪ Anti-HBc (IgM)	▪ Akute HBV Infektion; kommt auch mit niedrigen Titern bei chronischer Hepatitis B vor
▪ Anti-HBc (IgG)	▪ Überstandene oder chronische HBV Infektion
▪ Anti-HBs	▪ Überstandene HBV Infektion oder Marker für HBV Impfung; Immunität gegen HBV Infektion (Titer lässt Impferfolg beurteilen)
▪ Anti-HBe	▪ Niedrige HBV Replikation und Infektiosität; Marker für Therapieerfolg
▪ Anti-HBc (IgG) and anti-HBs	▪ Ausgeheilte HBV Infektion; kann anti-HBs negativ sein
▪ Anti-HBc (IgG) and HBsAg	▪ Chronische HBV Infektion
▪ Anti-HBc (IgG) und/ oder anti HBs und/oder HBV DNA (PCR)	▪ Latente oder occulte HBV Infektion

Tabelle I: Hepatitis B Virus serologische und virologische Marker (15)

### 3.2.11. Diagnostik der okkulten HBV Infektion

Um eine OBI nachzuweisen, reicht es nicht aus, serologische Marker wie HBsAg, anti-HBs und anti-HBc zu bestimmen. HBV DNA muss zusätzlich in Hepatozyten, in peripheren mononukleären Blutzellen oder im Serum bestimmt werden. Die Untersuchung der Hepatozyten setzt jedoch eine invasive Maßnahme, die Leberbiopsie, voraus. Eine Leberbiopsie birgt Risiken wie Blutungen, Peritonitis und Verletzungen anderer Organe. Wesentlich risikoärmer ist eine nichtinvasive Methodik mittels PCR, wobei der Nachweis der Virus-DNA im Serum oder in den PBMCs erfolgt und somit eine Blutprobe ausreichend ist.

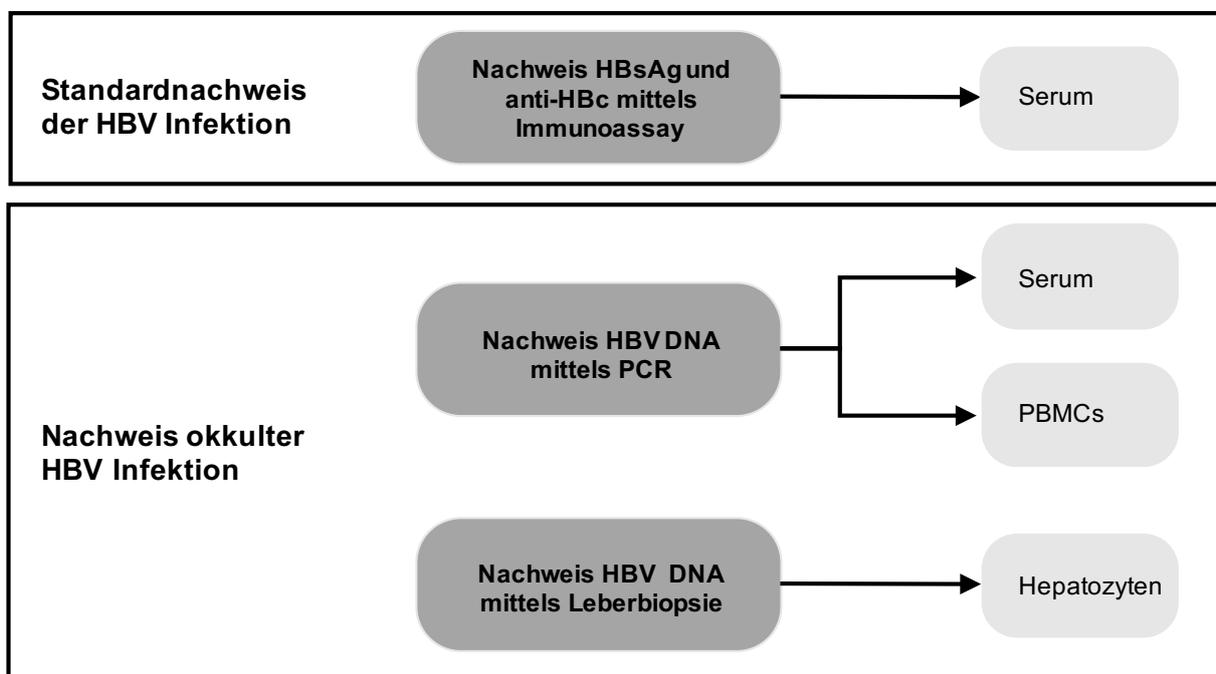


Abbildung IV: Standardnachweis HBV Infektion vs. Nachweis okkulte HBV Infektion

### 3.2.12. Hepatitis B Infektionen bei Hämodialyse-Patienten

Die Hauptursachen einer chronischen Niereninsuffizienz sind der primär insulinabhängige Diabetes mellitus, das nephrotische Syndrom, die hypertensive Nierenkrankheit und polyzystische Nieren (45). Eine weitere Ursache, die zu einer Niereninsuffizienz führen kann, ist der Langzeitgebrauch von Schmerzmedikamenten. Kommt es zu einer terminalen Niereninsuffizienz, so muss die Nierenfunktion durch Hämodialyse oder eine Nierentransplantation ersetzt werden. Die europäischen Empfehlungen geben hierbei vor, dass

bei einer GFR  $< 15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ , Urämiezeichen, unkontrollierbarem Blutdruck, Hydratation und schlechtem Ernährungszustand der Dialysebeginn erwogen werden sollte. Jedoch kann bei asymptomatischen Patienten immer eine abwartende Haltung eingenommen werden (46). Laut den internationalen KDIGO Guidelines sollte die Indikation der Dialyseeinleitung bei stark reduzierter GFR immer anhand der klinischen Zeichen gestellt werden. Mit klinischen Zeichen ist bei einer GFR zwischen  $5\text{--}10 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  zu rechnen (47).

In Deutschland bekommen derzeit ca. 83 000 Patienten eine chronische Hämodialyse, und ca. 2,7 % kommen jedes Jahr dazu. Im Jahre 2020 sollen es sogar 100 000 dialysepflichtige Patienten sein (48).

Das Immunsystem bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist stark beeinträchtigt, da die Niere die Clearancefunktion für Zytokine, lösliche Rezeptorproteine und Mediatoren übernimmt. Durch die abnehmende glomeruläre Filtrationsrate nimmt die Clearancefunktion ab und der Plasmaspiegel für immunologisch aktive Proteine wie Zytokine und Rezeptorproteine steigt. Auch der Toxin-Plasmaspiegel wie von  $\beta_2$ -Mikroglobulinen, Indoxylsulfaten, Homocysteinen, Harnsäuren und Parathormonen erhöht sich und beeinflusst das Immunsystem (46). So wurden mittlerweile bis zu 88 Urämie-Toxine identifiziert, von denen die biologischen Effekte teilweise sogar noch gar nicht bekannt sind (49).

Beim Dialysepatienten wird das Immunsystem zusätzlich durch das extrakorporale Verfahren beeinflusst, da durch die körperfremde Membran das Komplementsystem und zirkulierende Blutzellen aktiviert werden. Zusätzlich bilden sich Sauerstoffradikale sowie Glucose- und Eiweißmetaboliten, die die Monozyten in ihrer natürlichen Funktion beeinflussen. Die Phagozytose der Granulozyten und Monozyten wird soweit gestört, dass Bakterien nicht mehr genügend eliminiert werden, sich lokale Infektionen ausbreiten können und ihre antigenpräsentierende Funktion beeinträchtigt wird. Bleibt die Lymphozytenaktivierung durch antigenpräsentierende Zellen aus, so hat dies Einfluss auf die spezifische Immunabwehr des Körpers. T-Helferzellen stimulieren B-Zellen nicht mehr zur Antikörperproduktion.

Diesen Effekt sieht man auch bei der verminderten Impfreaktion bei Hepatitis B Impfungen, bei denen nur ein 60%iger Impferfolg zu verzeichnen ist. Durch die niedrigen Impftiter

müssen erweiterte Impfschemata angewandt werden, jedoch sind auch diese nicht immer erfolgreich.

Die gestörte Funktion der antigenpräsentierenden Zellen führt zusätzlich dazu, dass weniger zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert werden, die normalerweise die Lyse der Leberzellen auslösen und somit zwar zum Ikterus, aber auch zur Ausheilung beitragen. Das gestörte Immunsystem führt zu vermehrten Infektionen, die bei Dialysepatienten neben den kardiovaskulären Ereignissen mit 16 % eine der Hauptursachen für eine erhöhte Letalität sind. In Westeuropa handelt es sich zum größten Teil um bakterielle Infektionen wie Endokarditis, Haut- und Weichteilinfektionen, Urosepsis und Pneumonien. Jedoch spielen auch virale Infektionen eine große Rolle. Die HBV-Infektionen bei dialysepflichtigen Patienten sind in Westeuropa zwar zurückgegangen; in Ländern wie Rumänien, Brasilien oder Taiwan sind sie mit einer Prävalenz von bis zu 17,0 % immer noch ein großes Problem (46).

<b>Land</b>	<b>Hepatitis B</b>
USA	0,9%
Deutschland	1,2%
Spanien	2,2%
Italien	5,1%
Südfrankreich	7,2%
Taiwan	8,2%
Brasilien	12,0%
Rumänien	17,0%

Tabelle II: Prävalenz der Hepatitis B unter Dialysepatienten (46)

Gründe für das erhöhte Vorkommen sind die zu geringe Impfrate, das Benutzen derselben Hämodialyse-Geräte, unentdeckte Hepatitis B Infektionen und die unsterile Verarbeitung intravenöser Medikamente (50). Eine Hepatitis B Infektion verläuft bei chronischen Hämodialyse-Patienten oftmals asymptomatisch und geht in 80 % der Fälle in eine chronische Verlaufsform über. Die Chronifizierungsrate liegt dagegen bei nierengesunden Patienten bei 5 % (50).

### **3.2.13. Hepatitis B Infektionen bei Nierentransplantierten Patienten**

Neben der Dialyse zur Therapie einer terminalen Niereninsuffizienz gibt es die Möglichkeit der Nierentransplantation, in der die eigene Niere durch eine Spenderniere ersetzt wird. Weltweit werden jährlich ca. 80 000 Nieren transplantiert; in Deutschland sind es ca. 2100. Auf der Warteliste befinden sich in Deutschland etwa 7800 Patienten, die auf ein passendes Spenderorgan warten. Die Langzeitprognose nach einer Nierentransplantation ist sehr gut, nach 3 Jahren leben noch ca. 91 % der Patienten (51).

Der gestörte Immundefekt spielt auch hier die größte Rolle. Als zusätzliches Problem kommt jedoch bei einer bevorstehenden Transplantation die immunsuppressive Therapie hinzu. Die gebräuchlichsten Medikamente sind Cyclosporin A und Tacrolimus, die jedoch auch eine erhöhte Nephrotoxizität aufweisen. Mycophenolat-Mofetil hemmt die B-Zell-Antikörperproduktion, weshalb die Infektanfälligkeit weiter steigt. Methylprednisolon wird zur Vermeidung der Transplantatabstoßung angewendet, hat aber auch schwerwiegende Nebenwirkungen wie Katarakt, Osteoporose und Hautveränderungen, weshalb der Einsatz möglichst sparsam erfolgt. Der Gebrauch von Rapamycin kann zu ausgeprägten Wundheilungsstörungen und vermehrten Pneumocystis-carinii-Infektionen führen, weshalb auch hier präventive Medikationen mit Cotrimoxazol angezeigt sind. Azathioprin dagegen wird kaum noch, außer bei Schwangeren, angewandt. Da es jedoch sehr preiswert ist, wird es häufig in sogenannten Entwicklungsländern eingesetzt. Die Nachsorge nach einer Nierentransplantation fokussiert sich zunächst auf die Transplantatfunktion, wird jedoch im Laufe der Zeit zunehmend von der Therapie der Nebenwirkungen der immunsuppressiven Medikamente abgelöst, die eine akute oder chronische Transplantatabstoßung verhindern sollen (52).

Da es unter der immunsuppressiven Therapie auch zur Reaktivierung einer Hepatitis B Infektion kommen kann, müssen vor der geplanten Transplantation der Infektionsstatus des Spenders und derjenige des Empfängers geklärt werden (53).

### **3.2.14. Okkulte Hepatitis B Infektionen bei chronischen Hämodialyse- und Nierentransplantierten- Patienten**

Bisher gibt es nur wenige Daten über OBI bei chronischen Hämodialyse-Patienten und Nierentransplantierten, die zudem uneinheitliche Ergebnisse liefern. In einer Studie mit 67 Hämodialyse-Patienten konnten 7,5 % OBI in PBMC nachgewiesen werden (6), und

in einer weiteren Arbeit waren es sogar 54% (54). In einer Metaanalyse, die Dialysezentren zwischen 1992 und 2014 auf dokumentierte HBV-Infektionen untersuchte, waren es 2 Patienten (20%), die sich bei einem HBsAg negativen Spender infizierten (55). In einer italienischen Studie waren es dagegen 0% (56). Die unterschiedlichen Zahlen ergeben sich durch die Auswahlkriterien der Studienteilnehmer, den Testverfahren und deren Spezifität und Sensitivität, dem internen Umgang mit der Verwendung der Dialyseeinheiten und der Auswahl des Endemiegebietes (57). Die Prävalenz von OBI ist jedoch bei Patienten, die immunsupprimiert sind - dies ist regelmäßig bei Transplantationen und häufigen Bluttransfusionen der Fall - erhöht (58).

## 4. Zielsetzung der Arbeit

Die Datenlage über OBI ist bisher gering und sehr uneinheitlich. Es wurden zudem nur Studien mit relativ kleinen Patientengruppen durchgeführt, sodass in dieser Arbeit erstmalig mehr als 800 Patienten untersucht wurden. Ziel dieser Studie ist die Bestimmung des Vorkommens OBI in PBMC und/oder im Serum bei Nierentransplantierten und Hämodialyse-Patienten, die unter den standardisierten Tests HBsAg negativ getestet wurden. Hierzu wird eine hoch sensitive PCR eingesetzt, die HBV DNA im Serum und PBMC nachweisen soll. Außerdem wird mittels Erhebung weiterer Daten aus der Krankenakte untersucht, inwiefern es klinische und laborchemische Hinweise auf eine Lebererkrankung gibt, da Transaminasenerhöhungen als wichtiger diagnostischer Marker bei OBI weitgehend fehlen. Als Patientenkollektiv wurden chronische Hämodialyse-Patienten und Nierentransplantierte ausgewählt, da Patienten im Endstadium einer chronischen Niereninsuffizienz durch vermehrte Bluttransfusionen, extrakorporale Ersatzverfahren und Krankenhausaufenthalte zu den Risikogruppen gehören. Diese Patienten können sich schneller mit Hepatitis B infizieren und weisen durch das gestörte Immunsystem eine verminderte Immunantwort auf. Die standardisierten Tests weisen HBV Infektionen nach, indem sie virusspezifische Antikörper, zirkulierende virale Bestandteile oder HBV DNA nachweisen. Durch den Immundefekt haben sie somit möglicherweise eine geringere Sensitivität bei chronischen Hämodialyse-Patienten und Nierentransplantierten. Eine OBI wird definiert als die Abwesenheit von HBsAg im Serum bei gleichzeitigem HBV DNA-Nachweis im Serum und/oder in der Leber. Es gibt Hinweise darauf, dass HBV auch in extrahepatischen Zellen wie PBMC nachgewiesen werden können, während die herkömmlichen serologischen Tests keinen Hinweis auf eine Infektion geben. Somit kann es in Dialysezentren zu Infektionen bei Benutzungen der Dialyseeinheiten kommen. Die Reaktivierung des Virus bei Nierentransplantierten, die eine Spenderniere erhalten, stellt ein weiteres Risiko dar. Die Untersuchung von HBV DNA in PBMC und Serum mittels PCR kann okkulte Infektionen aufdecken, die mit serologischen Methoden unerkant bleiben. Somit können potenziell infektiöse Patienten besser diagnostiziert, Präventionen vor Übertragungen geschaffen und der Umgang mit der viralen Infektion bei chronischen Hämodialyse-Patienten und Nierentransplantierten verbessert werden. Das Ergebnis der Studie kann helfen, neue Screening-Untersuchungen für HBV zu entwickeln und die Risikofaktoren zu limitieren, sodass die Morbidität und die Mortalität signifikant erniedrigt

werden könnte. Der Nachweis einer OBI in den Hepatozyten setzt eine invasive Methode mit Risiken wie Blutungen voraus, sodass der Nachweis in PBMC ein wesentlich risikoärmeres Verfahren darstellt. Zeitgleich mit dieser Studie wurde die Prävalenz von okkul- ten Hepatitis C Infektionen in PBMC untersucht, das Ergebnis dieses Teils der Arbeit wird hier nicht weiter beschrieben. Teile dieser Studie wurden 2014 im Journal of Hepatology veröffentlicht (59). Die Daten dieser Dissertation wurden 2019 im Liver International pu- bliziert (60).

## **5. Material und Methoden**

### **5.1. Studiendesign**

Es handelt sich um eine klinisch-(experimentelle)-prospektive Querschnittsstudie.

### **5.2. Patienten**

Es wurden zwei Patientenkollektive untersucht: Patienten unter chronischer Hämodialyse und Nierentransplantierte, sowie zwei Kontrollgruppen.

Im Zeitraum von August 2009 bis Mai 2010 wurde von 417 Patienten in 6 Berliner Dialysezentren Blut entnommen und im Forschungslabor der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, untersucht.

Es wurden im Zeitraum von Mai 2010 bis März 2011 von 417 Patienten, die eine Nierentransplantation an der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, erhalten haben, Blut entnommen und ebenfalls im Forschungs-Labor der Charité-Universitätsmedizin Berlin untersucht.

### **5.3. Positiv-Kontrollen**

Als positiv Kontrolle wurden 20 Patienten aus der Klinik Hepatologie Charité im Zeitraum vom September 2010 bis Februar 2011, die serologisch HBsAg-positiv getestet waren, genommen. Sie waren nicht transplantiert und zeigten keine Anzeichen einer Leberzirrhose. 6 von 20 Patienten wurden antiviral therapiert.

### **5.4. Negativ-Kontrollen**

Es wurden 40 gesunde Freiwillige als Negativ-Kontrollen in die Studie eingeschlossen. Sie waren Serum anti-HBc- und HBsAg-negativ. Es gab keinerlei Hinweis auf eine durchgemachte oder aktuelle HBV-Infektion; sie zeigten normale Leberfunktionen und nahmen keine Medikamente ein.

## **5.5. Studienablauf**

Das Studienprotokoll hielt sich an die Deklaration von Helsinki-Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen und wurde von der Ethikkommission der Charité geprüft. Zunächst erfolgte die regelgerechte Aufklärung der Patienten und das Ausfüllen der standardisierten Fragebögen. Die folgenden Daten wurden von allen chronischen Hämodialyse-Patienten und Nierentransplantierten erfragt bzw. der bestehenden aktuellen Krankenakte entnommen:

**Datum der Registrierung:**

**Name:**

**Unit:**

**Alter:**

**Rasse:**

**Geschlecht:**

**Beruf:**

**Ursache der Erkrankung (Ursache der chronischen Niereninsuffizienz):**

**Beginn der Dialyse:**

**Transplantation:**

**Zeitpunkt:**

**Ursache der Abstoßung:**

**Rasse:**

**Transplantation:**

**Zeitpunkt:**

**Bluttransfusionen:**

**Anzahl:**

**Vorerkrankungen**

- Diabetes mellitus:
- Bluthochdruck:
- Herz-Kreislauf-Erkrankungen:
- Schlaganfall:

<b>Lebererkrankungen:</b>	
<b>Antivirale Therapie:</b>	
<b>Leberbiopsie:</b>	
<b>Datum:</b>	
<b>Diagnose:</b>	
<b>Alkohol (Gesamtdauer und Höhe des Konsums):</b>	
<b>Rauchen:</b>	
<b>Drogenmissbrauch i.v.:</b>	
<b>Weitere Medikamente (v.a. Antihypertonika, Diuretika, Lipidsenker, Steroide oder andere Immunsuppressiva):</b>	
<b>Blutdruck:</b>	
<b>Gewicht:</b>	
<b>Größe:</b>	
<b>BMI:</b>	
<b>Laborwerte zum Zeitpunkt der Erhebung:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hämoglobin:</li> <li>- Erythrozyten:</li> <li>- Leukozyten:</li> <li>- Thrombozyten:</li> <li>- Blut-Harnstoff:</li> <li>- Kreatinin:</li> <li>- Natrium:</li> <li>- Kalium:</li> <li>- Chloride:</li> <li>- Calcium:</li> <li>- Nüchternblutzucker:</li> <li>- HbA1c:</li> <li>- Bilirubin:</li> <li>- SGPT/ALAT:</li> <li>- SGOT/ASAT:</li> <li>- Alk. Phosphatase:</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GGT:</li> <li>- Albumin:</li> <li>- PT, PTT:</li> <li>- HBsAg, HBsAk:</li> <li>- HBeAg, HBcAk:</li> <li>- HBV-Viruslast (DNA) im Serum:</li> <li>- HCV-Ak:</li> <li>- HCV-Viruslast (RNA) im Serum:</li> <li>- HIV:</li> <li>- Gesamt Cholesterin:</li> <li>- Triglyzeride:</li> <li>- HDL:</li> <li>- LDL:</li> <li>- Eisen:</li> <li>- Ferritin:</li> </ul>

Abbildung V: Beispiel des Fragebogens

## **5.6. Citrat- oder EDTA-Blut**

Zunächst wurde eine Versuchsreihe von 20 Proben aufgestellt, um zu klären, welches Antikoagulanzen, Citrat oder EDTA, zur Blutentnahme verwendet werden sollte. Da in der Studie sowohl HCV-RNA als auch HBV DNA mittels PCR amplifiziert werden sollten, war es das Ziel, möglichst die Probengewinnung aus einem Antikoagulanzen durchzuführen, welches für beide Testverfahren die geringste Beeinträchtigung der PBMCs nach sich zieht. Im Vergleich von Citratblut und EDTA-Blut ergab sich kein Unterschied der zu untersuchenden Zellzahl. Sowohl Citrat als auch EDTA waren zur Probengewinnung und Weiterverarbeitung für die PCR-Analyse geeignet. Für diese Arbeit wurde Citratblut verwendet.

## **5.7. Probengewinnung**

Die Blutentnahme wurde bei den chronischen Hämodialyse-Patienten vor der Dialyse durchgeführt. Es wurden jeweils 20 ml Citratblut und 10 ml Serum von jedem Hämodialyse-Patienten und Nierentransplantierten entnommen und am selben Tag ins Labor transportiert. Das Serum wurde zentrifugiert und in gleichgroßen Aliquots bei -20 °C gelagert. Die PBMC-Isolierung erfolgte direkt am selben Tag. Zur Nachbestimmung der Hepatitis-Serologie und der Transaminasen wurde EDTA-Blut entnommen.

## **5.8. Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen**

Die Isolierung der PBMCs wurde aus dem Citratblut mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Hierzu benutzte man Ficoll-Paque als Separationsmedium und Leucosep-Röhrchen (Greiner Bio One GmbH, Deutschland). Die Leucosep-Röhrchen, bestehend aus transparentem Polypropylen, besitzen eine poröse Polyethylen-Trennscheibe. Diese ist durchsetzt mit Poren, wodurch sich Lymphozyten und PBMCs oberhalb der Trennscheibe separieren können und nach der Zentrifugation leicht abpipettieren lassen. Zunächst wurden 15 ml Ficoll-Paque in das Leucosep-Röhrchen pipettiert und anschließend zentrifugiert. Dann pipettierte man 15 ml DPBS (Dulbeccos's phosphatgepufferte Salzlösung) und die 20 ml Citratblutprobe in das Röhrchen. Nach der erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und der PBMC-Ring abpipettiert. Die PBMC

wurden mit 50 ml DPBS in einem Falcon-Röhrchen vermischt und erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, resuspendierte man das Zellpellet mit 10 ml DPBS, füllte es mit 50 ml DPBS auf und zentrifugierte die Suspension. Das gewonnene Zellpellet konnte, nachdem man den Überstand entnommen hatte, nun mit 5 ml DPBS resuspendiert und ein Aliquot zur Zellzählung entnommen werden. Hierzu wurde eine Neubauer Zellkammer benutzt. Es wurden Aliquots mit 2,5 Millionen Zellen als Zellpellets hergestellt und bei -80 °C eingefroren. Während der gesamten Präparation wurden sterile Bedingungen unter einer sterilen Werkbank mit laminarem Flow eingehalten, um eine Kontamination mit HBV DNA zu verhindern.

## **5.9. Diagnostik der HBV Infektion**

### **5.9.1. Serologische Diagnostik**

Die Diagnostik der HBV Infektion erfolgte serologisch durch Nachweis von anti-HBc, HBsAg und anti-HBs mit dem Abbott Architect Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay (CMIA) (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) nach Herstellerangaben. Es wurden jeweils 500 Mikroliter Serum verwendet. Es handelte sich um einen Immunoassay zum Nachweis von HBsAg, anti-HBs und anti-HBc im Serum. Zum qualitativen Nachweis von HBsAg wurden die Proben mit anti-HBs beschichteten paramagnetischen Mikropartikeln und anti-HBs-akridiniummarkiertem Konjugat zu einem Reaktionsgemisch vermischt. Das nachzuweisende HBsAg reagierte mit den anti-HBs-beschichteten Mikropartikeln und dem anti-HBs-akridiniummarkierten Konjugat. Es folgte nach dem Waschen die Zugabe von ergänzendem Waschpuffer. Nach einem weiteren Waschzyklus wurden dem Reaktionsgemisch Pre-Trigger- und Triggerlösung zugegeben. Die resultierende Chemilumineszenzreaktion wurde in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Die Menge an HBsAg in der Probe war zu den vom optischen System des ARCHITECT *i* Systems gemessenen RLE direkt proportional. Der Nachweis von HBsAg in der Probe erfolgt durch den Vergleich des aus der Reaktion entstehenden Chemilumineszenzsignals mit dem Grenzwertsignal einer aktiven Kalibrierung. Ist das Chemilumineszenzsignal in der Probe größer oder gleich dem Grenzwertsignal, so gilt die Probe als reaktiv für HBsAg. Zum quantitativen Nachweis von anti-HBs im Serum wurde ein Zwei-Schritt-Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay eingesetzt. Zunächst wurde die Probe mit mit

rekombinantem HBsAg (rHBsAg) beschichteten paramagnetischen Mikropartikeln gemischt. Das nachzuweisende anti-HBs bindet an die mit rHBsAg beschichteten Mikropartikel. Es folgte ein Waschschrift. Im zweiten Schritt wurde das akridiniummarkierte rHBsAg-Konjugat zugegeben. Nach einem weiteren Waschzyklus wurden dem Gemisch Pre-Trigger- und Triggerlösung zugegeben. Die resultierende Chemilumineszenzreaktion wurde in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Die Menge an anti-HBs in der Probe ist direkt proportional zu den vom optischen System des ARCHITECT <sup>\*</sup> Systems gemessenen relativen Lichteinheiten. Anhand einer Architect Anti-HBs Kalibrierungskurve konnte die anti-HBs-Konzentration der Probe bestimmt werden. Ein Wert größer oder gleich 10,0 mIE/ml galt als reaktiv für anti-HBs (61).

Als weiterer Parameter wurde anti-HBc mittels Architect Immunoassay bestimmt. Es handelte sich dabei um einen qualitativen Nachweis im Zwei-Schritt-Immunoassay. Der erste Schritt umfasst die Mischung der Probe, dem Assay-Verdünnungsmittel, dem Probenverdünnungsmittel und die mit rHBcAg beschichteten paramagnetischen Mikropartikel. In der Probe vorhandenes anti-HBc band an die mit rHBcAg beschichteten Mikropartikel, und das Reaktionsgemisch wurde anschließend gewaschen. Im darauffolgenden Schritt wurden das anti-human-akridiniummarkierte Konjugat dazugegeben und ein weiterer Waschzyklus angeschlossen. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von Pre-Trigger- und Triggerlösung, sodass die Chemilumineszenzreaktion ausgelöst wurde, die erneut in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen wurde. Die Menge an anti-HBc in der Probe ist zu den vom optischen System des ARCHITECT <sup>i</sup> Systems gemessenen RLE direkt proportional. Der Nachweis von anti-HBc in der Probe erfolgt durch den Vergleich des aus der Reaktion entstehenden Chemilumineszenzsignals mit dem Grenzwertsignal einer aktiven Kalibrierung des ARCHITECT Anti-HBc II Assays. Ist das Chemilumineszenzsignal in der Probe größer oder gleich dem Grenzwertsignal, gilt die Probe als reaktiv für anti-HBc.

Proben ohne Ergebnisse wurden mittels Siemens Enzygnost Assay (Siemens Healthcare Diagnostics Products, Deutschland) nach Herstellerangaben erneut getestet (62).

Bei Leberzell-Schädigungen steigen die Aktivitäten der Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT) und Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT) an. Sie sind somit als Indikator der Leberzellschädigung relevant. Zur Bestimmung der Enzyme wurde ebenfalls der Abbott Architect immunoassay nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Normalwerte für AST und ALT lagen bei Männern bei < 50 U/l und bei Frauen bei < 35 U/l.

### **5.9.2. Molekularbiologische Diagnostik**

Zur quantitativen Bestimmung der HBV-DNA diente der COBAS TaqMan HBV-Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) (63). Dieser teilt sich in die Probenvorbereitung und PCR-Amplifikation auf und wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Die Probenvorbereitung diente zur Gewinnung der HBV DNA. Durch Inkubation mit einer Protease und einem Lyse-/Bindepuffer bei hohen Temperaturen wurden das HB-Virus lysiert und die nachzuweisende Virus-DNA freigesetzt. Der Lysepuffer war zeitgleich auch der Schutz vor DNasen, die sich im Serum befanden. Nach Zugabe einer bekannten Anzahl von HBV-Quantifizierungsstandard-DNA-Molekülen wurde Isopropanol zugegeben. Das entstandene Lyse-Gemisch wurde durch eine Säule mit Glasfaser-Filtereinsatz zentrifugiert. HBV DNA und HBV-Quantifizierungsstandard-DNA banden an den Glasfaserfilter und wurden so von den anderen Substanzen getrennt. Anschließend wurde die gebundene DNA mit Waschpuffer gewaschen und mit Elutionspuffer eluiert. Das so gewonnene Probenmaterial wurde dem Amplifikationsgemisch zugeführt. Durch Erhitzung des Gemischs im Thermozykler des COBAS Taqman 48 Analyzers wurde die Ziel-DNA denaturiert, und die Primer konnten sich nach der Abkühlung an die spezifischen Zielsequenzen anlagern. Die thermostabile *Thermus specie*-DNA-Polymerase synthetisierte mittels  $Mn^{2+}$  und Desoxynukleotidtriphosphaten das Amplifikat. In jedem Zyklus wurde die Verdopplung der DNA erreicht, wobei nicht das gesamte HBV-Genom amplifiziert wurde und die Anzahl der Zyklen vorher festgelegt werden konnte. Die Real-Time-PCR detektierte die Emissionsintensität der fluoreszierenden Reporterfarbstoffe, die an Fluoreszenzsonden gebunden waren. Die HBV- und die HBV-Quantifizierungsstandard-Sonde wurden unterschiedlich markiert und somit auch bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Die Nachweisgrenze beim COBAS Taqman lag bei 6 IU/ml. Bei den Positivkontrollen, die HBsAg positiv waren, wurde der HBV DNA-Nachweis mit dem Roche Molecular Systems Amplicor HBV Monitor Assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Sensitivität lag bei diesem Test bei 100 IU/ml.

### **5.10. Statistische Auswertung**

Um bei der statistischen Auswertung der Prävalenz einer okkulten Hepatitis B Infektion eine hohe Genauigkeit von 95 % zu erhalten, wurde die Patientenzahl in jedem Patientenkollektiv auf 400 Patienten festgelegt. Die Ergebnisse der kontinuierlich gemessenen

Daten werden als Mittelwerte dargestellt (Standardabweichung), und kategoriale Variablen werden als Anteil ausgedrückt, sofern nicht anders angegeben.

Die Patientendaten aus den Fragebögen und die Testergebnisse wurden in einer prospektiven Datenbank/Tabelle (Excel Windows) zusammengetragen.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Dialysepatienten

#### 6.1.1. Demografisch und klinisch

Von 417 Patienten konnte bei 14 Patienten der serologische Marker anti-HBc nicht bestimmt werden. Außerdem war die Bestimmung von HBV DNA bei 22 Patienten in PBMCs und bei 5 Patienten im Serum nicht möglich. Somit konnten 376 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, wovon 174 weibliche und 202 männliche Patienten waren. Das Durchschnittsalter lag bei 66 Jahren, wobei der jüngste Patient 24 Jahre und der älteste 96 Jahre alt war. Die Patienten gehörten vorwiegend der kaukasischen Rasse an (98 %). 45,2 % der Patienten hatten Diabetes mellitus und 88,8 % einen arteriellen Hypertonus. Nahezu alle Patienten hatten eine dokumentierte Herz-Kreislauf-Erkrankung. 24,2 % der Patienten waren Raucher oder hatten einen Nikotinabusus in der Anamnese. Eine Alkoholerkrankung lag nur bei 4,8 % der Patienten vor. Die Dauer der Dialysetherapie war durchschnittlich 4,9 Jahre lang. 51 (13,6 %) Patienten erhielten während ihrer Krankengeschichte Bluttransfusionen. Eine Transaminasenerhöhung konnte bei 15,3 % der Patienten nachgewiesen werden, wobei es sehr unterschiedliche Ausprägungen gab. Keiner der Patienten wurde mit antiviralen Medikamenten therapiert.

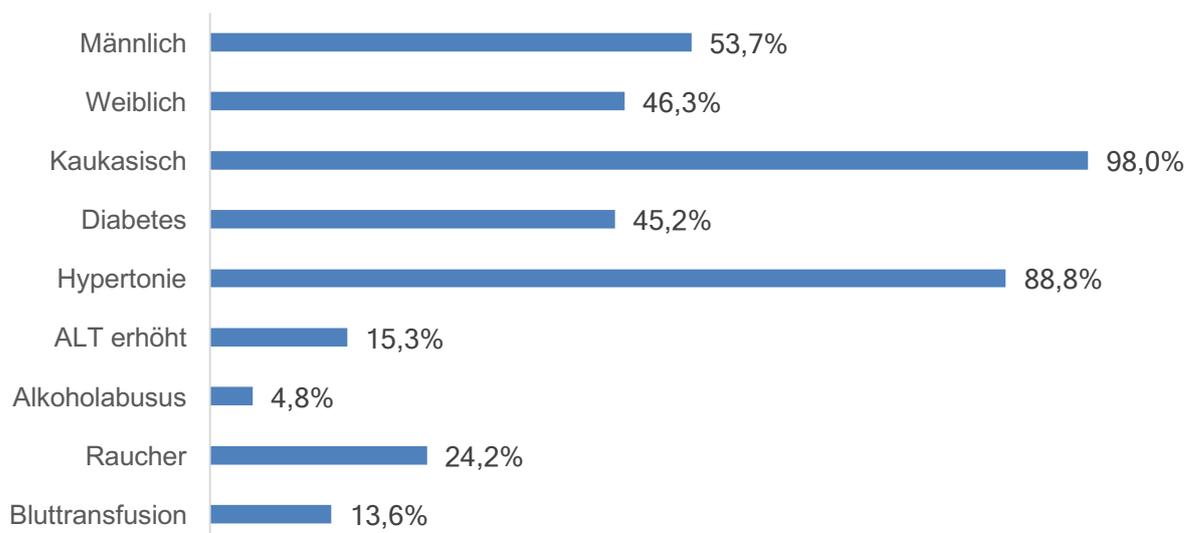


Abbildung VI: Demografische und klinische Parameter der untersuchten Dialysepatienten (N=376)

### **6.1.2. Prävalenz OBI bei Dialysepatienten**

HBsAg war bei 2 von 376 Patienten (0,5 %) positiv; bei beiden Patienten konnte HBV DNA im Serum nachgewiesen werden. Die Prävalenz von OBI lag bei 0 %, da bei den HBsAg negativen Patienten weder im Serum noch in PBMCs HBV DNA nachgewiesen werden konnte. Der Impferfolg lag bei 47 % (151/320); es konnte anti-HBs, jedoch nicht anti-HBc nachgewiesen werden. Bei 17 % (9/54) der Patienten konnte nur anti-HBc ohne Nachweis von anti-HBs und HBsAg nachgewiesen werden. Die folgende Grafik fasst die Untersuchungsergebnisse der 417 Dialysepatienten zusammen:

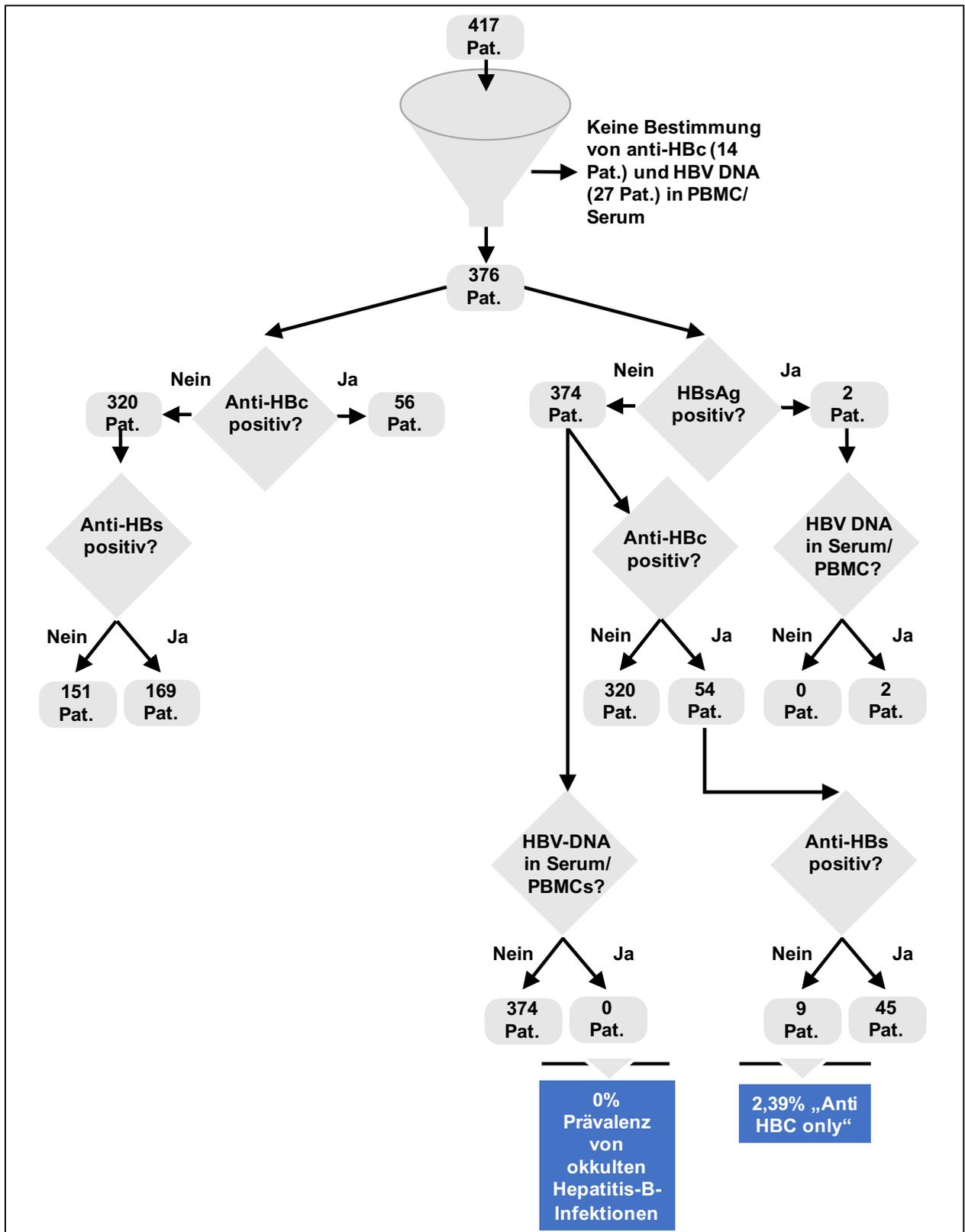


Abbildung VII: Prävalenz okkulten Hepatitis B Infektionen bei Dialysepatienten

## 6.2. Nierentransplantierte

### 6.2.1. Demografisch und klinisch

Von den 417 Patienten waren 60 % männliche und 40 % weibliche Patienten in die Studie eingeschlossen. Das Durchschnittsalter lag bei diesem Patientenkollektiv bei 53 Jahren, wobei der jüngste Patient 18 Jahre und der älteste Patient 79 Jahre alt war. 99 % der Patienten gehören der kaukasischen Rasse an. Auch in diesem Patientenkollektiv war bei fast jedem Patienten eine Herz-Kreislaufkrankungen in der Krankenakte dokumentiert. 97,8 % hatten arteriellen Bluthochdruck und 29,5 % Diabetes mellitus. Der Anteil der Raucher oder einer positiven Nikotinabusus-Anamnese lag bei 89,7 %. An einer Alkoholkrankung litten 1,2 %. Durchschnittlich waren 6,6 Jahre seit der letzten Nierentransplantation vergangen. Die Transaminasen waren bei 12,5 % der Patienten erhöht. 14 Patienten erhielten eine antivirale Therapie mit Lamivudine oder Tenofovir, da sie HBsAg positiv getestet wurden.

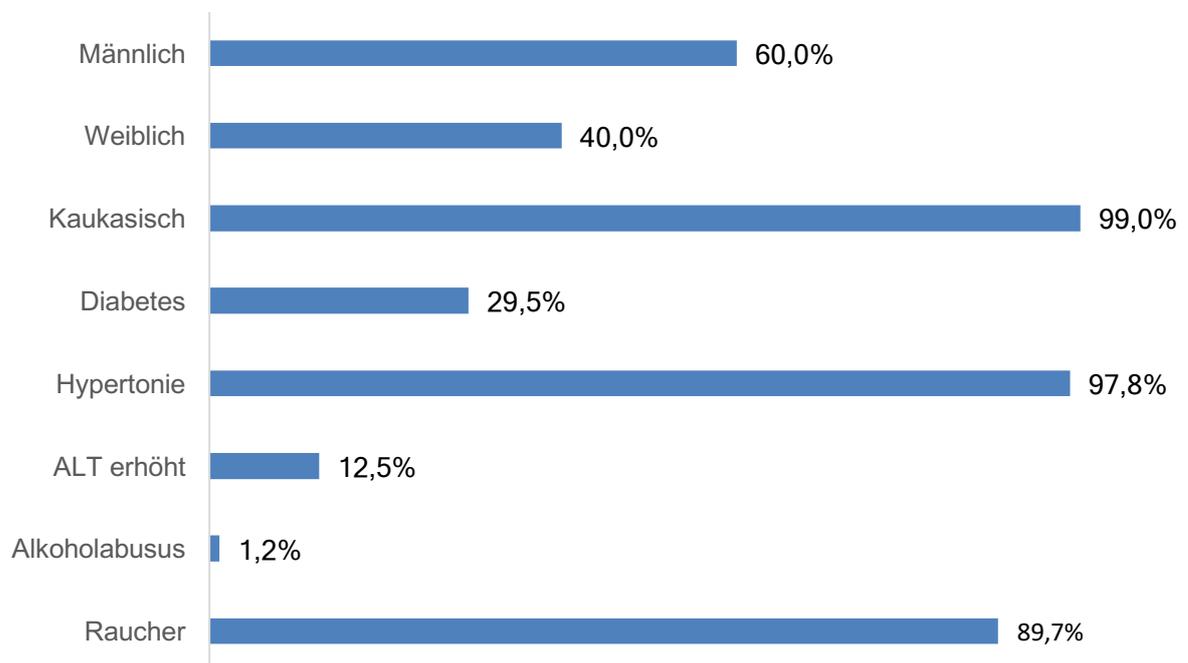


Abbildung VIII: Demografische und klinische Parameter der untersuchten nierentransplantierten Patienten (N=417)

### 6.2.2. Prävalenz OBI bei Nierentransplantierten

14 (3,4 %) der 417 Nierentransplantierten waren HBsAg positiv getestet worden, und bei 28,6 % (4/14) wurde eine Viruslast im Serum nachgewiesen. In den PBMCs konnte keine Viruslast nachgewiesen werden. Bei einem dieser Patienten war die Viruslast so groß (die Nachweisgrenze von 1910 IU/ml wurde überschritten), dass man von einer Lamivudine-Resistenz ausgehen konnte und die Medikation auf Tenofovir umgestellt wurde. Die Viruslast der drei anderen Patienten lag unter 200 IU/ml, sodass von einer erfolgreichen antiviralen Therapie auszugehen war. Der Marker anti-HBc war bei 68/417 (16,3 %) der Nierentransplantierten nachweisbar, wobei davon 54 Patienten HBsAg negativ waren und weder im Serum noch in den PBMCs Virus-DNA nachweisbar war. 7,4 % der 54 HBsAg negativ und anti-HBc positiv getesteten Patienten waren auch anti-HBs negativ. Insgesamt waren somit 4 Patienten anti-HBc negativ getestet. Bei 210/349 Patienten, die anti-HBc negativ getestet waren, waren anti-HBs positiv und lassen somit Rückschlüsse auf einen stattgefundenen Impferfolg ziehen. Eine OBI konnte bei einem Patienten nachgewiesen werden, indem Virus-DNA im Serum, jedoch nicht in PBMCs nachweisbar und lediglich anti-HBs positiv war. Die Prävalenz lag somit bei diesem Patientenkollektiv bei 0,24 % (1/417). Der Impferfolg lag bei 60,2 % (210/349); es konnte anti-HBs, jedoch nicht anti-HBc nachgewiesen werden. Bei 7,4 % (4/54) der Patienten konnte nur anti-HBc nachgewiesen werden. Die folgende Grafik fasst die Untersuchungsergebnisse der 417 Nierentransplantierten zusammen:

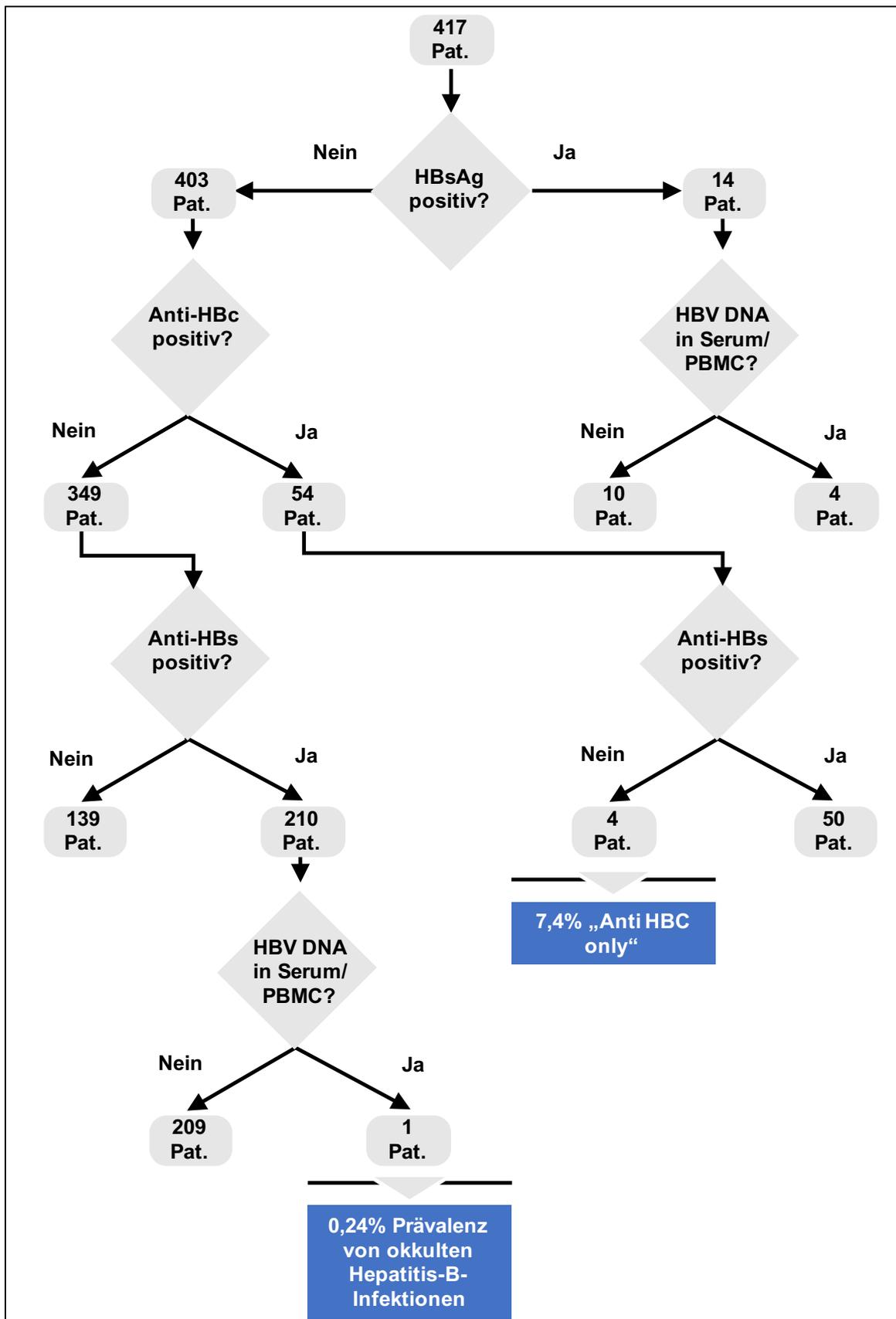


Abbildung IX: Prävalenz von okkulten Hepatitis B Infektionen bei Nierentransplantationspatienten

Es konnte in diesem Patientenkollektiv, laut der Definition, nur eine einzige OBI nachgewiesen werden. Es handelte sich um eine 73-jährige, weibliche Patientin, deren Nierentransplantation 2008 erfolgte. Die Hepatitis-Serologie für HCV, HDV und HBV war negativ. Die HBV-Serologie im Speziellen war folgende: anti-HBc negativ, HBsAg negativ, HBeAg negativ, anti-HBe negativ und anti-HBs positiv mit einem Titer von 126 IU/ml. Im März 2009 mussten aufgrund einer Polyomavirus-Infektion – eine nicht seltene Komplikation nach Nierentransplantationen– die immunsuppressive Therapie reduziert und ein Wechsel von Tacrolimus zu Cyclosporin A durchgeführt werden. Die Blutentnahme und die Untersuchung fanden im Februar 2011 statt. Dabei wurde im Serum, jedoch nicht in den PBMC HBV-DNA mit 20 IU/ml und 29 IU/ml nachgewiesen. Im November 2011 musste aufgrund einer beginnenden Abstoßungsreaktion mit Steroiden und einem erneuten Wechsel zu Tacrolimus behandelt werden. Der anti-HBs Titer wurde jährlich kontrolliert. 2012 fiel der Titer dann unter  $< 100$  IU/ml und war im Juni 2016 sogar negativ. Im Dezember 2016 wurden dann in einer Routine-Untersuchung HBsAg, HBeAg und anti-HBc positiv getestet. Die weiteren serologischen Marker waren negativ. Es erfolgte die quantitative HBV-DNA-Bestimmung mit  $> 70$  Millionen IE/ml, woraufhin eine antivirale Therapie mit Tenofovir eingeleitet wurde. Die Patientin erhielt zum Zeitpunkt der Transplantation eine Bluttransfusion. Abgesehen davon wurden nach der Nierentransplantation keine weiteren Ereignisse für eine mögliche Übertragung (parenteral, sexuell, horizontal) dokumentiert.

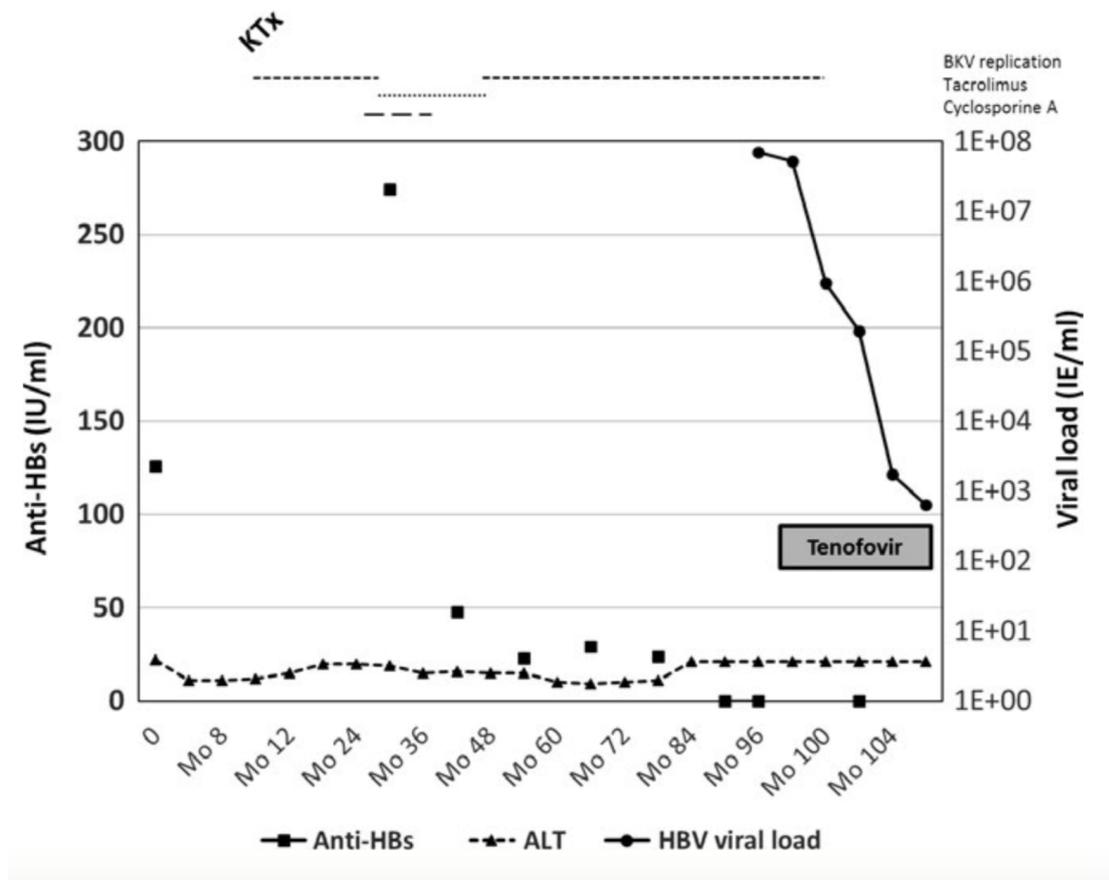


Abbildung X: Langzeit-Follow-up des OBI Patienten (mit anti-HBs Titer, ALT Nachweis und HBV Viruslast) (60)

### 6.3. Positiv-Kontrollen

Es wurden 20 Positiv-Kontrollen in die Studie eingeschlossen, die HBsAg positiv waren. Bei 6 Positiv-Kontrollen wurde eine antivirale Therapie durchgeführt, und es konnte im Serum und in PBMCs keine Virus-DNA nachgewiesen werden. In den weiteren 14 Positiv-Kontrollen konnte bei 3 Virus-DNA im Serum und in den PBMCs und bei 11 nur im Serum nachgewiesen werden. Es gab somit keinen alleinigen Nachweis von HBV-DNA in den PBMCs.

### 6.4. Negativ-Kontrollen

Bei 6 der 40 Teilnehmer konnte anti-HBc nicht bestimmt werden; deshalb wurden nur 34 Kontrollen in die Studie eingeschlossen. Sie waren alle HBsAg negativ.

## 7. Diskussion

### 7.1. Relevanz der Studie

Hepatitis B Infektionen gehören weltweit zu den Erkrankungen mit schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen. Während die Hepatitis B Infektion nach einer Latenzzeit von wenigen Wochen mit herkömmlichen Tests diagnostiziert werden kann, bleibt eine okkulte Infektion manchmal sogar Jahrzehnte unerkannt und kann so keiner geeigneten Therapie zugeführt werden; dies stellt natürlich eine potenzielle Ansteckungsgefahr dar. In dieser Studie sollte die Prävalenz der OBI in einem großen Patientenkollektiv bestimmt werden, da die Datenlage zur Prävalenz sehr uneinheitlich ist. Sie reicht in anderen Studien mit Dialysepatienten von 0 % bis 58 % (56). Bisher gibt es keine weitere vergleichbar große Studie, die bei Dialysepatienten und Nierentransplantierten die Prävalenz von OBI im Serum und PBMC untersucht hat. Da die Hepatitis B Infektion eine der Hauptursachen für schwere Erkrankungen wie Leberzirrhose und hepatozelluläre Karzinome (HCC) ist (64) (65), ist es von großer Wichtigkeit, auch okkulte Infektionen zu identifizieren und mit einer geeigneten Therapie zu behandeln. Vor allem OBI scheinen die Grundlage zur Entwicklung eines HCCs zu sein (66). Die latente Infektion bewirkt eine zwar milde, aber über die Jahre andauernde Leberentzündung, die der Zirrhose und im weiteren Verlauf dem HCC vorausgeht (67). OBI können der Grund für ungeklärte Hepatitiden und ein Problem bei Bluttransfusionen und Organtransplantationen sein (68). Eine immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation kann zur Reaktivierung der Infektion führen und so die Überlebenswahrscheinlichkeit signifikant beeinflussen (69).

### 7.2. Entwicklung der OBI

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze zur Entwicklung der OBI. Ein möglicher Grund ist, dass Zytokine wie TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  die HBV Genexpression und Replikation hemmen (70) und somit soweit unterdrückt werden, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze liegen und nur bei einer immunsupprimierenden Situation wieder nachweisbar sind. Ein weiterer Ansatz ist, dass Mutationen im S Gen des HBsAg nicht von den herkömmlichen Tests erfasst werden. Diese Varianten befinden sich in der MHR (major hydrophilic region) des HBsAg (71). Sie können auch nach der Serokonversion im Träger verbleiben, und so

eine Infektionsquelle darstellen (72). Außerdem spielen Koinfektionen mit HCV eine Rolle, da das HCV core Protein die HBV Replikation unterdrücken kann (67). Im Mausmodell von Mc Clary et al wurde sogar nachgewiesen, dass eine Infektion mit *Schistosoma mansoni* diese Inhibition auslösen kann (73).

### **7.3. Beurteilung der angewandten Diagnostik/ Methodik**

Zur Bestimmung der HBV Infektionen wurde in dieser Studie die PCR angewandt, um HBV DNA in Serum und PBMCs nachzuweisen. Zunächst wird in der Routinediagnostik eine HBV Infektion mit dem serologischen Marker HBsAg nachgewiesen, der bei einer Persistenz von mindestens 6 Monaten sogar ein Zeichen der Chronifizierung der Erkrankung ist. Gleichzeitig lässt sich eine hohe Viruslast nachweisen, und Transaminasewerte geben Aufschluss über den Schweregrad der Hepatitis. In der Vergangenheit wurde davon ausgegangen, dass das Verschwinden von HBsAg, der Nachweis von Antikörpern gegen HBsAg und Normalwerte der Transaminasen eine durchgestandene Infektion dokumentieren (74). Es zeigte sich jedoch erstmalig in den 1980iger-Jahren und in weiteren Studien, dass auch bei Abwesenheit serologischer Marker HBsAg noch eine geringe Viruslast zu finden ist. Auch scheint das Erreichen der Transaminasennormalwerte kein Hinweis auf Heilung zu sein, da bei dialysepflichtigen Patienten die Transaminasen unterdrückt sind (38). Die alleinige Bestimmung des Markers HBsAg reicht nicht aus, um OBI aufzudecken. In weiteren Studien wurde das Vorkommen der OBI in verschiedenen Patientenkollektiven, Endemiegebieten, unterschiedlichen Labormethoden und Proben untersucht. Hierbei hat sich zur Diagnostik der OBI die RT-PCR und nested PCR durchgesetzt, um quantitativ HBV DNA nachzuweisen. Keine der beiden Methoden scheint einen Vorteil gegenüber der anderen zu haben (75) ; die Sensitivität ist jedoch entscheidend. Um ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten, wurde in dieser Studie eine hoch sensitive PCR mit einer Sensitivität von 6 IU/ml eingesetzt. In anderen Studien mit einer Prävalenz von 0,0 % lag die Sensitivität nur bei 100 IU/ml (76), sodass es fraglich ist, ob die Sensitivität ausreichend hoch lag, um versteckte Infektionen nachzuweisen. Auch in der Routinediagnostik liegt die Sensitivität bei 100 IU/ml. Dies könnte zu falsch negativen Ergebnissen führen, da gerade bei OBI die Replikationsrate verringert ist (77) (78). Zudem kann man davon ausgehen, dass Studien, die keine PCR zum Nachweis der Virus-DNA angewendet haben, auch niedrigere Prävalenzen von OBI vorweisen (79).

## **7.4. Beurteilung des Untersuchungsmaterials**

Es ist davon auszugehen, dass sich das Virusgenom nicht nur in den Hepatozyten, sondern auch in anderen Blutzellen wie den PBMC befindet. HBV DNA wurde bereits in PBMC nachgewiesen (80) (81) (82) (83). Die HBV DNA-Anzahl deckte sich mit der Viruslast im Serum. Es wurde sogar HBV DNA in PBMC nachgewiesen, obwohl im Serum jegliche serologischen Marker auf eine Infektion fehlten. In einer Studie von Oesterreicher et al. zeigte sich eine Prävalenz von 7,5 % in PBMC (6). In weiteren Studien ergab sich in PBMC sogar eine Prävalenz von 54 % (54). Allgemein gibt es jedoch bisher nur wenige Untersuchungen zu HBV DNA in PBMC. In der vorliegenden Studie ließ sich eine OBI bei einem Nierentransplantierten im Serum nachweisen. Es zeigte sich jedoch keine OBI in PBMC, sodass die Untersuchung von PBMC hier keinen Vorteil zu haben scheint. Dieses ergab auch eine Studie von Cabrerizo et al (80), in der die Prävalenz von OBI im Serum und PBMCs gleich groß war. Serum als Untersuchungsmaterial hat sich in den meisten Studien für OBI durchgesetzt, und dies kann durch unsere Studie bestätigt werden. Die erfolgreichste Methode, eine OBI nachzuweisen, ist jedoch nach wie vor die Leberbiopsie (84). Der Nachweis bei HBsAg-negativen Patienten gelingt hier sogar noch viele Jahren nach dem Verschwinden von HBsAg im Serum (85). Durch ihren invasiven Eingriff, die Nebenwirkungen und Kontraindikationen kann sie jedoch nicht bei allen Patienten, wie auch nicht bei Dialysepatienten, angewendet werden.

## **7.5. Beurteilung der Prävalenz von 0,24 %**

In der vorliegenden Studie lag die Prävalenz von OBI bei Dialysepatienten bei 0% und bei Nierentransplantierten bei nur < 1 %. Es konnte keine OBI bei 376 Dialysepatienten und eine bei 417 Nierentransplantierten aufgedeckt werden, was eine Prävalenz von 0,24 % (1/417) ergab. Dieser Nachweis von OBI bei Nierentransplantierten Patienten zeigt, dass trotz einer anti-HBc negativen Serologie die Möglichkeit einer OBI besteht und somit diese Risikogruppe zusätzlich auf HBV DNA getestet werden muss (60). Aufgrund der Transplantation und des supprimierten Immunsystems kann hier nicht immer von einer sicheren serologischen Diagnostik ausgegangen werden. Nur so kann eine rechtzeitige antivirale Therapie initiiert werden, um gravierende Spätfolgen zu vermeiden. Die HBV-Serologie zum Zeitpunkt der Transplantation der OBI-Patientin war – bis auf anti-HBs –

negativ. Der Anti-HBs-Titer als Zeichen der Immunisierung reduzierte sich im Laufe der Jahre, und es erfolgte keine Impf-Boosterung, um den Schutz aufrechtzuerhalten. Somit stellt sich die Frage, ob es sich in diesem Fall um die Reaktivierung einer OBI oder um eine Neuinfektion mit dem Virus handelte. Der niedrige HBV DNA-Nachweis 2011 lässt auf eine Reaktivierung einer OBI schließen, da es bis auf die einmalige Bluttransfusion 2008 keine weiteren Risikofaktoren, wie sexuelle oder parenterale Übertragungen, für eine Transmission gab (60).

## **7.6. Beurteilung des Parameters anti-HBc**

Als weiteres Kriterium für eine okkulte Infektion gilt anti-HBc, auch anti-HBc „only“ oder „alone“ genannt, wenn alle anderen Marker negativ sind (86). Anti-HBc only konnte oftmals als einziger Hinweis auf eine okkulte HBV-Infektion ausgemacht werden. So waren es in einer Studie von Weber et al. 14,4 % Patienten, die anti-HBc positiv waren und bei denen HBV DNA nachgewiesen werden konnte (87). In unserer Studie waren es 2,4 % der Dialysepatienten und 0,96 % der Nierentransplantierten, die nur anti-HBc positiv waren. Jedoch konnte in keinem dieser Patienten eine OBI bestimmt werden, weshalb die Bestimmung von anti-HBc als Nachweis einer okkulten Infektion in dieser Studie nicht bestätigt werden konnte.

## **7.7. Auswahl des Endemiegebietes**

OBI scheinen eine niedrige Prävalenz bei dem untersuchten Patientenkollektiv zu haben. Dies kann daran liegen, dass vornehmlich Patienten kaukasischer Herkunft untersucht wurden. So war auch in einer Studie in Italien bei 213 HBsAg negativen Hämodialyse-Patienten die Prävalenz 0 % (56) und in einer Studie in Griechenland lag sie bei 0,9 % (77). Dem widerspricht jedoch eine Studie aus Nordamerika, die eine Prävalenz von 3,8 % beschreibt, wovon 78 % Patienten kaukasischer Herkunft waren (78). Es kann jedoch die Prävalenz von Hepatitis B Infektionen in der allgemeinen Bevölkerung ausschlaggebend sein. In Endemiegebieten mit einer niedrigen Prävalenz wie Japan, England und Brasilien ist auch mit einer niedrigeren Prävalenz von OBI zu rechnen. Dieses bestätigt eine Studie aus Brasilien mit einer Prävalenz von 2,3 % (88). Ist die Zahl der

HbsAg-positiven Träger in der Bevölkerung gering, so korreliert dies auch mit dem Nachweis von HBV-DNA in HBsAg negativen Individuen (89). Somit ist es nicht sinnvoll, in Ländern mit einer niedrigen Hepatitis B-Prävalenz, HBV DNA-Screenings einzuführen, die wesentlich teurer als das Routinescreening für HBsAg sind. In Endemiegebieten wie Afrika, Osteuropa oder im Amazonasgebiet, die eine hohe Hepatitis B-Prävalenz haben, kann ein aufwendigeres Screening-Verfahren für OBI jedoch durchaus sinnvoll sein und die Mortalität und Morbidität signifikant erniedrigen.

Diesem widerspricht jedoch, dass in Ländern wie Österreich und der Schweiz Daten von 40–58 % vorliegen (6) (90) und in einem Land wie Südkorea mit einem hohen Anteil an HBsAg positiven Trägern eine niedrige Prävalenz von 2,3 % (75) bei Nierentransplantierten nachgewiesen wurde. Hier müssten nochmals größere Studien durchgeführt werden, um die Zahlen zu betätigen.

## **7.8. Auswahl des Patientenkollektivs**

Weiterhin kann die Wahl des Patientenkollektivs sein relevant für die Prävalenz von OBI sein. So ist es bisher nicht in allen Studien bewiesen, dass Dialysepatienten wirklich ein höheres Risiko für eine HBV Infektion haben. Geht man davon aus, dass keine Bluttransfusionen stattgefunden haben und nur die Hämodialyse als Risikofaktor dient, so gibt es keine einheitlichen Daten, die ein erhöhtes Risiko belegen (91). Bei Nierentransplantierten dagegen erhöht sich das Risiko einer Primärinfektion, wenn der Spender zwar HBsAg negativ jedoch HBcAk positiv getestet wurde. Die Gefahr der Reaktivierung unter immunsuppressiver Therapie ist groß (92). Zusätzlich gehen immer mehr Transplantation-Zentren aufgrund der langen Wartelisten dazu über, vermehrt Spender zu akzeptieren, die an einer Hepatitis B oder C erkrankt sind oder waren (93). Auch die Auswahl des Transplantats kann eine Auswirkung auf das Transmissionsrisiko haben, denn es scheint bei einer Nierentransplantation wesentlich seltener zu einer postoperativen Reaktivierung von HBV zu kommen als bei Lebertransplantationen, wenn der Spender anti-HBs positiv war (94).

Man geht davon aus, dass die Prävalenz in bestimmten Patientengruppen wie Hämodialyse-Patienten, Organtransplantierte, Drogenkonsumenten sowie HIV- und HCV-Infizierte höher als in der allgemeinen Bevölkerung ist (95) (96). So kann ein Hinweis für

eine OBI ein positives anti-HCV-Ergebnis sein (88). Dies kann jedoch nicht von dieser und auch anderen Studien bestätigt werden (97) (98).

## **7.9. Auswahl des Antikoagulanz**

Des Weiteren kann das verwendete Antikoagulanz einen nicht unerheblichen Effekt auf den Nachweis der HBV DNA mittels PCR haben, da sich gezeigt hat, dass Heparin als Störfaktor den Nachweis hemmt und EDTA oder Citrat geeigneter Antikoagulanzien sind (74). Dieser Störeffekt zeigte sich jedoch in anderen Studien nicht (54). Obwohl bei Patienten, die an einer CMV-Infektion erkrankt sind, der Nachweis in PBMCs in EDTA-Blut besser als in Citrat-Blut gelang (99), bestätigte sich dieses in einer vergleichbar großen Versuchsreihe in unserer Studie nicht. Es war kein Unterschied zwischen Citrat- und EDTA-Blut nachweisbar.

## **7.10. Relevanz genetischer und epigenetischer Faktoren**

Genetische Faktoren scheinen keine große Relevanz bei OBI zu haben, da man sowohl bei HbsAg-positiven als auch bei HbsAg-negativen HBV DNA-Trägern eine hohe genetische Varianz nachgewiesen hat (100). Trotzdem scheint das Immunsystem des Individuums eine tragende Rolle bei der Unterdrückung bzw. Eradikation von HBsAg zu spielen. Und auch epigenetische Faktoren beeinflussen die Entwicklung einer OBI, indem sie in die Funktion der cccDNA und in die HBV-Replikation eingreifen (101). Dabei werden verschiedene Histone der cccDNA deacetyliert und methyliert sowie die HBV-DNA methyliert. Zumindest konnte diese epigenetisch modifizierte cccDNA bei inaktiven HBV-Trägern, anti-HBe positiven Trägern während einer niedrigen Replikationsphase und Patienten mit OBI nachgewiesen werden (101). In einer Studie, die ausschließlich eine separate Inuit-Gemeinschaft umfasste, ergab sich eine Prävalenz von OBI von 8 % bei gleichzeitiger Abwesenheit serologischer Marker. Es gab keinerlei Verbindung zu Alter, Geschlecht oder Leberenzymen. Jedoch zeigten fast alle Träger eine S-Variante im HBsAg Genom (78).

## 7.11. Vorteile und Limitationen der Studie

Die Vorteile dieser Studie sind die große Patientenzahl unter Einschluss definierter Kriterien und der Vergleich sowohl mit Positiv als auch Negativ Kontrollen. Außerdem wurde ein hochsensitiver PCR-Test angewandt, der Kontaminationen mit DNA oder RNA nahezu ausschließt und eine hohe Sensitivität von 6 IU/ml besitzt. In der Studie wurden zahlreiche klinische Faktoren der Patienten dokumentiert und der nachgewiesene OBI Fall im Langzeitverlauf mehrmals erneut auf HBV DNA und weitere Laborparameter getestet. Als Probenmaterial wurden Serum und PBMCs ausgewählt, um das Risiko einer Leberbiopsie zu minimieren und zeitgleich die Manifestation einer extrahepatischen Infektion nachzuweisen. Die fehlende Testung auf HBV DNA in einer Leberbiopsie ist jedoch zeitgleich ein Nachteil dieser Studie, da der Nachweis von HBV DNA in Hepatozyten die sicherste Methode ist, eine OBI nachzuweisen. Außerdem wurde als Studiendesign die Querschnittsstudie gewählt, die es ermöglicht, diese große Patientenzahl zu rekrutieren. Der Nachteil hiervon ist, dass durch die fehlenden Untersuchungen im Langzeitverlauf Patienten nicht erfasst werden, die fluktuierende HBV DNA-Werte aufweisen. Allerdings wären wiederholte Messung auch in der Routinediagnostik nicht praktikabel, da es einem hohen zeitlichen und logistischen Aufwand bedarf, der sich so im klinischen Bereich nicht leicht realisieren lässt (60).

## 7.12. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde keine OBI bei Dialysepatienten nachgewiesen, so dass in Gebieten niedriger Hepatitis B Prävalenzen keine zusätzliche Labordiagnostik durch aufwendige und teure Tests notwendig sind. Der Nachweis einer OBI bei Nierentransplantierten Patienten zeigt jedoch, dass in dieser Patientengruppe auch bei anti-HBc-negativer Serologie eine Testung auf HBV DNA erfolgen sollte. Die separate Untersuchung von PBMC auf HBV DNA hat keinen Vorteil ergeben, da sich eine OBI nur im Serum nachweisen ließ. Die Ergebnisse dieser Studie können jedoch nicht generalisiert auf alle Bevölkerungsgruppen angewandt werden, da in dieser Studie Patienten aus einem Endemiegebiet mit niedriger Prävalenz der Hepatitis B Infektionen rekrutiert wurden. In einem Land mit einem hohen Vorkommen sind durchaus andere Studienergebnisse möglich.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Lozano R1, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380, 2012, S. 2095-128.

2. Fabrizi F, Martin P, Bunnapradist S. Treatment of chronic viral hepatitis in patients with renal disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 33, 2004, S. 655-670.

3. Baid-Agrawal S, Pascual M, Moradpour D, Frei U, Tolkoff-Rubin N. Hepatitis C virus infection in hemodialysis and kidney transplant patients. *Rev Med Virol.* 18, 2008, S. 97-115.
4. Sharif MR, Chitsazian Z, Moosavian M, Raygan F, Nikoueinejad H, Sharif AR, Einollahi B. Immune disorders in hemodialysis patients. *Iran J Kidney Dis.* 9(2), 2015, S. 84-96.
5. Conrad A. Farrar, Jerzy W. Kupiec-Weglinski und Steven H. Sacks. The Innate Immune System and Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3(10), 2013.
6. Christian Oesterreicher, Johann Hammer, Ulrike Koch, Franz Pfeffel, Gere Sunder-Plassmann, Dagmar Petermann and Christian Müller. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis. *Kidney International.* 1995, Bd. 48, S. 1967-1971.
7. Christian Bréchet, M.D., Françoise Degos, M.D., Claire Lugassy, M.D., Valérie Thiers, Serge Zafrani, M.D., Dominique Franco, M.D., Henri Bismuth, M.D., Christian Trépo, M.D., Jean-Pierre Benhamou, M.D., Jack Wands, M.D., Kurt Isselbacher, M.D., Pierre Tiollais, M.D. and Pierre Berthelot, M.D. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med.* 312, 1985, 5, S. 270-6.
8. Giovanni Raimondo, Jean-Pierre Allain, Maurizia R. Brunetto, Marie-Annick Buendia, Ding-Shinn Chen, Massimo Colombo, Antonio Craxì, Francesco Donato, Carlo Ferrar, Giovanni B. Gaeta, Wolfram H. Gerlich, Massimo Levrero, Stephen Locarnini, Thomas Michalak, Mario U. Mondelli, Jean-Michel Pawlotsky, Teresa Pollicino, Daniele Prati, Massimo Puoti, Didier Samuel, Daniel Shouval, Antonina Smedile, Giovanni Squadrito, Christian Trépo, Erica Villa, Hans Will, Alessandro R. Zanetti, Fabien Zoulim. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. [Hrsg.] Elsevier. *Journal of Hepatology.* 49, 2008, S. 652-657.
9. Noonan CA, Yoffe B, Mansell PW, Melnick JL, Hollinger FB. Extrachromosomal sequences of hepatitis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83, 1986, S. 5698-5702.
10. Pietro Lambertico, Kosh Agarwal, Thomas Berg, Maria Buti, Harry L.A. Janssen, George Papatheodoridis, Fabien Zoulim, Frank Tacke. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology.* 2017.

11. Tiollais P, Pourcel C, Dejevan A. The hepatitis B virus. *Nature*. 317, 1985, S. 489-495.
12. Prof. Dr. Gholamreza Darai, Dr. Michaela Handermann, Prof. Dr. Hans-Günther Sonntag, Dr. Christian A. Tidona, Prof. Dr. Lothar Zöller. *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*. 3. s.l. : Springer, 2008.
13. Juergen Beck, Michael Nassal. Hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology*. 13(1), 2007, S. 48-64.
14. Tobias Heintges, Dieter Häussinger. *Hepatitis B Infektion-Therapie-Prophylaxe*. Stuttgart : Thieme, 2006.
15. Liang, T. Jake. Hepatitis B: The Virus and Disease. *Hepatology*. 49, 2009, S. 13-21.
16. Christoph Seeger, William S. Mason. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(1), 2000, S. 51-68.
17. D. Adam, H.W. Doerr, H. Link, H. Lode. *Die Infektiologie*. s.l. : Springer, 2004.
18. Aaron Shu Jeng Woo, Raymond Kwok, Taufique Ahmed. Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *Annals of Translational Medicine*. 5(7), 2017.
19. Vincent Rijckborst, Harry L.A. Janssen. The Role of Interferon in Hepatitis B Therapy. *Current Hepatitis Reports*. 9(4), 2010, S. 231-238.
20. Monjardino JP, Saldanha JA. Delta hepatitis. The disease and the virus. *Br Med Bull*. 46, 1990, S. 399-407.
21. G Fattovich, G Giustina, E Christensen, M Pantalena, I Zagni, G Realdi, S W Schalm, and the European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut*. 46, 2000, S. 420-426.
22. Robert G Gish, Debbie Hana Yi, Steve Kane, Margaret Clark, Michael Mangahas, Sumbella Baqai, Mark A Winters, James Proudfoot und Jeffrey S Glenn. Coinfection with hepatitis B and D: Epidemiology, prevalence and disease in patients in Northern California. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 28, 2013, S. 1521-1525.

23. Irene Cacciola, Teresa Pollicino, Giovanni Squadrito, Giovanni Cerenzia, Maria Elena Orlando und Giovanni Raimondo. Occult Hepatitis B Virus Infection in patients with chronic Hepatitis C liver disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999, S. 22-25.
24. Jinlin Hou, Zihua Liu, Fan Gu. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *International Journal of Medical Sciences*. 2(1), 2005, S. 50-57.
25. WHO. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. 2015.
26. Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, Brink EW, Goldstein ST, Wang SA, Moyer LA, Bell BP, Alter MJ. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR Recomm REP*. 2005, 54, S. 1-31.
27. Stefos A, Gatselis N, Zachou K, Rigopoulou E, Hadjichristodoulou C, Dalekos GN. Descriptive epidemiology of chronic hepatitis B by using data from a hepatitis registry in Central Greece. *Eur J Intern Med*. 20(1), 2009, S. 35-43.
28. Caterall, RD. Some observations on the epidemiology and transmission of hepatitis B. *British Journal of Venereal Diseases*. 54(5), 1978, S. 335-340.
29. Lisa Rosenblum, William Darrow, John Witte, Judith Cohen, John French, Parkash S. Gill, John Potterat, Keith Sikes, Rick Reich Stephen Hadler. Sexual Practices in the Transmission of Hepatitis B Virus and Prevalence of Hepatitis Delta Virus Infection in Female Prostitutes in the United States. *JAMA*. 267(18), 1992, S. 2477-2481.
30. Karen H Seal, Brian R Edlin, Kristen C Ochoa, Jacqueline P Tulsky, Andrew R Moss, Judith A Hahn. Risk of hepatitis B infection among young injection drug users in San Francisco: opportunities for intervention. *West J Med*. 172(1), 2000, S. 16-20.
31. Robert Koch-Institut. Hepatitis B und D RKI-Ratgeber für Ärzte. *Epidemiologisches Bulletin* 33/2000. 2016.
32. Liliane C Meireles, Rui Tato Marinho, Pierre Van Damme. Three decades of hepatitis B control with vaccination. *World Journal of Hepatology*. 7(18), 2015, S. 2127-2132.

33. Poethko-Muller C, Zimmermann R, Hamouda O, Faber M, Strak K, Ross RS, Thamm M. Epidemiology of hepatitis A, B and C among adults in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 56, 2013, S. 707-15.
34. WHO Global Hepatitis Report, 2017. 2017.
35. Lee, WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. 337, 1977, S. 1733-1745.
36. JR., Larrubia. Occult hepatitis B virus infection: A complex entity with relevant clinical implications. *World J Gastroenterol*. 2011, Bd. 17, 12.
37. Vicente Carreno, Javier Bartolomé, Inmaculada Castillo und Juan Antonio Quiroga. Occult hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. *Rev Med Virol*. 18, 2008, S. 139-157.
38. Fabrizi F, Lunghi G, Finazzi S, Colucci P, Pagano A, Ponticelli C, Locatelli F. Decreased serum aminotransferase activity in patients with chronic renal failure: impact on the detection of viral hepatitis. *Dis, Am J Kidney*. 38, 2001, S. 1009-1015.
39. Zuger, Abigail. Normal Liver Enzyme Levels in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology*. 134, 2008, S. 1376.
40. Mel Kraiden, Gail McNabb, Martin Petric. The laboratory diagnosis of hepatitis B virus. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 16(2), 2005, S. 65-72.
41. Jing-Hsiung Ou, Chau-Ting Yeh, T. S. Benedict Yen. Transport of Hepatitis B Virus Precore Protein into the Nucleus after Cleavage of Its Signal Peptide. *Journal of Virology*. 63, 1989, S. 5238-5243.
42. Liaw, Yun-Fan. HBeAg seroconversion as an important end point in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology International*. 3(3), 2009, S. 425-433.
43. ROTHEN Medizinische Laboratorien AG. <https://virushepatitis.ch>. [Online] [Zitat vom: 20. 07 2018.] <https://virushepatitis.ch/hepatitis-formen/>.
44. Georg Löffler, Petro E. Petrides. *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. s.l. : Springer, 2003.

45. Deutsche Stiftung Organtransplantation. [Online] 2016. [Zitat vom: 14. März 2018.] <https://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/nierentransplantation.html>.
46. Prof. Dr. Matthias Girndt, Prof. Dr. Martin K. Kuhlmann. Aktuelle Behandlungsstrategien in der Hämodialyse. 3. Bremen : UNI-MED, 2014.
47. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease–mineral and bone disorder (CKD-MBD). KDIGO. 2017.
48. Silvia Klein, Kathrin Lottmann, Patrick Gierling, Hans-Holger Bleß. Status quo und Zukunft der Heimdialyse. s.l. : Nomos, 2014.
49. Flore Durantou, Gerald Cohen, Rita De Smet, Mariano Rodriguez, Joachim Jankowski, Raymond Vanholder, Angel Argiles, on behalf of the European Uremic Toxin Work Group. Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins. J Am Soc Nephrol. 2012, Bd. 23, S. 1258–1270.
50. F. Blaine Hollinger, Peiman Habibollahi, Ali Daneshmand, Seyed Moayed Alavian. Occult Hepatitis B Infection in Chronic Hemodialysis Patients: Current Concepts and Strategy . Hepatitis Monthly. 2010.
51. Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung. [Online] [Zitat vom: 15. März 2018.] <https://www.organspende-info.de/organ-und-gewebespende/organe/nierentransplantation>.
52. M. G. Krukemeyer, A.E. Lison. Transplantationsmedizin Ein Leitfaden für den Praktiker. Berlin : de Gruyter, 2006.
53. Andrew A. Klein, Clive J. Lewis and Joren C. Madsen. Organ Transplantation A Clinical Guide. UK : Cambridge University Press, 2011.
54. Maria Cabrerizo, Javier Bartolomé, Patricia de Sequera, Carlos Caramelo and Vicente Carreno. Hepatitis B Virus DNA in Serum and Blood Cells of Hepatitis B Surface Antigen-Negative Hemodialysis Patients and Staff. Journal of the American Society of Nephrology. 1997, S. 1443-1447.

55. Fabrizi F, Dixit V, Messa P, Martin P. Transmission of hepatitis B virus in dialysis units: a systematic review of reports on outbreaks. *Int J Artif Organs*. 38(1), 2015, S. 1-7.
56. F. Fabrizi, P. G. Messa, G. Lunghi, F. Aucella, S. Bisegna, S. Mangano, M. Villa, F. Barbisoni, E. Rusconi & P. Martin. Occult hepatitis B virus infection in dialysis patients: a multicentre survey. [Hrsg.] Blackwell Publishing Ltd. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005, Bd. 21, S. 1341–1347.
57. Ismail H, Soliman M, Ismail N. Occult hepatitis B virus infection in Egyptian hemodialysis patients with or without hepatitis C virus infection. *Pathol Lab Med Int*. 2, 2010, S. 113-120.
58. Ghada F. Helaly, Ebtisam F. El Ghazzawi, Sherine M. Shawky, Farag M. Farag. Occult hepatitis B virus infection among chronic hemodialysis patients in Alexandria, Egypt. [Hrsg.] Elsevier. *Journal of Infection and Public Health*. 8, 2015, S. 562-569.
59. Baid-Agrawal S, Schindler R, Reinke P, Staedtler A, Rimpler S, Malik B, Frei U, Berg T. Prevalence of occult hepatitis C infection in chronic hemodialysis and kidney transplant patients. *Journal of Hepatology*. 60(5), 2014, S. 928-933.
60. Marion Muche, Thomas Berg, Sunda Rimpler, Adrienne Staedtler, Stefan Böhm, Peter Nickel, Seema Baid-Agrawal. Low prevalence of occult hepatitis B virus infection in chronic haemodialysis and kidney transplant patients. *Liver International*. 2019, 39, S. 263-270.
61. ABBOTT Diagnostics Division. Anti-HBs. Architect System. 2008.
62. Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH. Enzygnost Anti-HBc monoclonal. 2010.
63. Roche Diagnostics. COBAS TaqMan HBV Test; High Pure System Viral Nucleic Acid Kit. Indianapolis, USA : s.n., 2007.
64. Kazuki Ohba, Shoji Kubo, Akihiro Tamori, Kazuhiro Hirohashi, Hiromu Tanaka, Taichi Shuto, Shuhei Nishiguchi und Hiroaki Kinoshita. Previous or Occult Hepatitis B Virus Infection in Hepatitis B Surface Antigen-Negative and Anti-Hepatitis C-Negative Patients with Hepatocellular Carcinoma . [Hrsg.] Springer-Verlag. *Surgery Today*. 2004, 34, S. 842–848.

65. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis.* 2(8), 2002, S. 479-486.
66. Giovanni Squadrito, Teresa Pollicino, Irene Cacciola, Gaia Caccamo, Daniela Villari, Tiziana La Masa, Tea Restuccia, Eugenio Cucinotta, Claudio Scisca, Domenico Magazzu, Giovanni Raimondo. Occult Hepatitis B Virus Infection Is Associated with the Development of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C Patients. [Hrsg.] American Cancer Society. *Cancer.* 2006, Bd. 106, 6, S. 1326-1330.
67. Giovanni Raimondo, Teresa Pollicino, Irene Cacciola, Giovanni Squadrito. Occult hepatitis B virus infection. [Hrsg.] Elsevier. *Journal of Hepatology.* 46, 2007, S. 160–170.
68. Larrubia, Juan Ramon. Occult hepatitis B virus infection: A complex entity with relevant clinical implications. *World J Gastroenterol.* 17(12), 2011, S. 1529-1530.
69. G.-D. Chen, J.-L. Gu, J. Qiu, L.-Z. Chen. Outcomes and risk factors for hepatitis B virus (HBV) reactivation after kidney transplantation in occult HBV carriers. [Hrsg.] John Wiley & Sons A/S. *Transplant Infectious Disease.* 0, 2013, S. 1–6.
70. Guidotti G, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptative immune response. *Annu Rev Immunol.* 19, 2001, S. 65-91.
71. Hou J, Karayiannis P, Walters J, Luo K, Liang C, Thomas H. A unique insertion in the S gene of surface antigen-negative hepatitis B virus Chinese carriers. *Hepatology.* 21, 1995, S. 273-278.
72. Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol.* 68(4), 1994, S. 2671-2676.
73. Mc Clary H, Koch R, Chisari FV, Guidotti LG. Inhibition of hepatitis B virus replication during schistosoma mansoni infection in transgenic mice. *J Exp Med.* 192, 2000, S. 289-294.
74. Thomas I, Michalak, Claudio Pasquinelli, Stephane Guilhot, and Francis V. Chisari. Hepatitis B Virus Persistence after Recovery from Acute Viral Hepatitis. *J. Clin. Invest.* 93, 1994, S. 230-239.

75. Eunsin Bae, Chang-Hun Park, Chang-Seok Ki, Sung-Joo Kim, Wooseong Huh, Ha-Young Oh & Eun-Suk Kang. Prevalence and clinical significance of occult hepatitis B virus infection among renal transplant recipients in Korea. [Hrsg.] Informa Healthcare. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 44, 2012, S. 788–792.
76. Ruth Nogueira Cordeiro Moraes Jardim, Neiva Sellan Lopes Gonçalves, Josiane Silveira Felix Pereira, Viviane Cristina Fais and Fernando Lopes Gonçalves Junior. Occult Hepatitis B Virus Infection in Immunocompromised Patients. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 12(4), 2008, S. 300-305.
77. Paraskevi Mina, Sarah P Georgiadou, Christos Rizos, George N Dalekos, Eirini I Rigopoulou. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in haemodialysis patients from central Greece. [Hrsg.] Baishideng. *World J Gastroenterol*. 16(2), 2010, S. 225-231.
78. Gerald Y. Minuk, Dong Feng Sun, Rebecca Greenberg, Manna Zhang, Kimberly Hawkins, Julia Uhanova, Adam Gutkin, Kevin Bernstein, Antonio Giulivi und Carla Osiowy. Occult Hepatitis B Virus Infection in a North American Adult Hemodialysis Patient Population. *Hepatology*. 40, 2004, S. 1072–1077.
79. Venkatakrisna Shyamala, Phillip Arcangel, Joshua Cottrell, Doris Coit, Angelica Medina-Selby, Colin McCoin, Dennis Madriaga, David Chien und Bruce Phelps. Assessment of the Target-Capture PCR Hepatitis B Virus (HBV) DNA Quantitative Assay and Comparison with Commercial HBV DNA Quantitative Assays. *Journal of clinical microbiology*. 42, 2004, 11, S. 5199-5204.
80. Cabrerizo M, Bartolome J, Carreno V. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by a defective hepatitis B virus with a deletion in the PreS1 region of the viral genome. *Journal of viral hepatitis*. 9(4), 2002, S. 265-71.
81. Murakami Y, Minami M, Daimon Y, Okanou T. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *Journal of medical virology*. 72(2), 2004, S. 203-14.
82. Lu L, Zhang H Y, Yueng Y H, Cheung KF, Luk JM, Wang FS, Lau GK. Intracellular levels of hepatitis B virus DNA and pregenomic RNA in peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *Journal of viral hepatitis*. 16(2), 2009, S. 104-12.

83. Stoll-Becker S, Repp R, Glebe D, Schaefer S, Kreuder J, Kann M, Lampert F, Gerlich WH. Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients. *Journal of virology*. 71(7), 1997, S. 5399-407.
84. Georgiadou SP, Zachou K, Liaskos C, Gabeta S, Rigopoulou EI, Dalekos GN. *Liver International*. Occult hepatitis B virus infection in patients with autoimmune liver diseases. 29, 2009, S. 434-442.
85. Andrew L. Mason, Lizhe Xu, Linsheng Guo, Mary Kuhns und Robert P. Perrillo. Molecular Basis for Persistent Hepatitis B Virus Infection In the Liver After Clearance of Serum Hepatitis B Surface Antigen. *Hepatology*. 27(6), 1998, S. 1736-1742.
86. Vitale F, Tramuto F, Orlando A, Vizzini G, Meli V, Cerame G, Mazzucco W, Virdone R, Palazzo U, Villafrate MR, Tagger A, Romano N. Can the serological status of anti-HBc alone be considered a sentinel marker for detection of occult HBV infection? *J Med Virol*. 80(4), 2008, S. 577-82.
87. Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol*. 64(3), 2001, S. 312-319.
88. Andrea Martins Melo Fontenele, Juliana Braga Furtado Gainer, Daniel Viana da Silva E Silva, Max Diego Cruz Santos, João Victor Salgado, Natalino Salgado Filho, Adalgisa Sousa Paiva Ferreira. Occult hepatitis B among patients with chronic renal failure on hemodialysis from a capital city in northeast Brazil . *Hemodialysis International*. 2015, S. 1-7.
89. Y-M D Lo, E S-F Lo, W Z Mehal, M Sampietro, G Fiorelli, G Ronchi, C H Tse, K A Fleming. Geographical variation in prevalence of hepatitis B virus DNA in HBsAg negative patients. *J Clin Pathol*. 46, 1993, S. 304-308.
90. Joller-Jemelka HI, Wicki AN, Grob PJ. Detection of HBs antigen in "anti-HBc alone" positive sera. *J Hepatol*. 21, 1994, S. 269-272.
91. David W. Johnson, Hannah Dent, Qiang Yao, Anders Tranaeus, Chiu-Chin Huang, Dae-Suk Han, Vivekanand Jha, Tao Wang, Yoshindo Kawaguchi and Jiaqi Qian. Frequencies of hepatitis B and C infections among haemodialysis and peritoneal dialysis patients in Asia-Pacific countries: analysis of registry data. *Nephrol Dial Transplant*. 24, 2009, S. 1598–1603.

92. Smaragdi Marinaki, Kyriaki Kolovou, Stratigoula Sakellariou, John N Boletis, Ioanna K Delladetsima. Hepatitis B in renal transplant patients. *World Journal of Hepatology*. 9(25), 2017, S. 1054-1063.
93. Massimiliano Veroux, Vincenzo Ardita, Daniela Corona, Alessia Giaquinta, Burcin Ekser, Nunziata Sinagra, Domenico Zerbo, Marco Patane, Cecilia Gozzo, Pierfrancesco Veroux. Kidney Transplantation from Donors with Hepatitis B. *Medical Science Monitor*. 22, 2016, S. 1427-1434.
94. Wachs ME, Amend WJ, Ascher NL, Bretan PN, Emond J, Lake JR, Melzer JS, Roberts JP, Tomlanovich SJ, Vincenti F. The risk of transmission of hepatitis B from HBsAg (-), HBcAb (+), HBIgM (-) organ donors. *Transplantation*. 59, 1995, S. 230-234.
95. Grob P., Jilg W., Bornhak H., Gerken G, Gerlich W, Günther S, Hess G, Hüdig H, Kitchen A, Margolis H, Michel G, Trepo C, Will H, Zanetti A, Mushahwar I. Serological pattern "Anti-HBc Alone": Report on a workshop. *J Med Virol*. 62, 2000, S. 450-5.
96. Goncales Junior F.L., Pereira J.S.F., Silva C., Thomaz G.R., Pavan M.H.P., Fais V.C., Magna L.A., Goncales N.S.L. Hepatitis B virus DNA in sera of blood donors and of patients infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003, S. 10718-20.
97. A.A. Peres, E.A. Dias, M. Chesky, M.R. Alvares-da-Silva, L.F. Jobim, L.F. Goncalves, R.C. Manfro. Occult hepatitis B in renal transplant patients. *Transplant Infectious Disease*. 7, 2005, S. 51-56.
98. Mona A. Abu El Makarem, Mohammed Abdel Hamid, Ashraf Abdel Aleem, Ahmed Ali, Mohammed Shatat, Douaa Sayed, Ali Deaf, Lamia Hamdy, Effat A. Tony. Prevalence of Occult Hepatitis B Virus Infection in Hemodialysis Patients From Egypt With or Without Hepatitis C Virus Infection. *Hepat Mon*. 12(4), 2012, S. 253-8.
99. Nachiketa Patnaik, Radha Kanta Ratho, Baijayantimala Mishra, Anuradha Chakraborty, Vinay Kumar Sakhuja. Comparison of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium citrate as anticoagulants in collection of samples for cytomegalovirus pp65 antigen detection in renal transplant recipients with suspected cytomegalovirus disease . [Hrsg.] Elsevier. *Journal of Virological Methods*. 2008, S. 319-321.

100. Perumal Vivekanandan, Rajesh Kannangai, Stuart C. Ray, David L. Thomas and Michael Torbenson. Comprehensive Genetic and Epigenetic Analysis of Occult Hepatitis B from Liver Tissue Samples. *Clinical Infectious Diseases*. 46, 2008, S. 1227-36.

101. Massimo Levrero, Teresa Pollicino, Jorg Petersen, Laura Belloni, Giovanni Raimondo, Maura Dandri. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 51, 2009, S. 581-592.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sunda Rimpler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Prävalenz okkultter Hepatitis B Infektionen bei chronischen Hämodialyse- und Nierentransplantierten Patienten* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 9.1. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sunda Rimpler hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Seema Baid-Agrawal, Ralf Schindler, Petra Reinke, Adrienne Staedtler, Sunda Rimpler, Barbara Malik, Ulrich Frei, Thomas Berg, *Prevalence of occult hepatitis C infection in chronic hemodialysis and kidney transplant patients*, Journal of Hepatology, 2014

Beitrag im Einzelnen: Begleitung der zu Grunde liegenden Studie über den gesamten Zeitraum und Mitverantwortlichkeit für die organisatorische Durchführung und Datenerfassung: Rekrutierung von Patienten und Kontrollen in die Studie, Sammlung und Transport von Blutproben, Präparation der Blutproben und Isolation der PBMCs, Sammlung und Analyse der Daten, Datenverarbeitung und Tabellierung der Resultate.

Publikation 2: Marion Muche, Thomas Berg, Sunda Rimpler, Adrienne Staedtler, Stefan Böhm, Peter Nickel, Seema Baid-Agrawal, *Low prevalence of occult hepatitis B virus infection in chronic haemodialysis and kidney transplant patients*, Liver International, 2018

Beitrag im Einzelnen: Begleitung der zu Grunde liegenden Studie über den gesamten Zeitraum und Mitverantwortlichkeit für die organisatorische Durchführung und Datenerfassung: Rekrutierung von Patienten und Kontrollen in die Studie, Sammlung und Transport von Blutproben, Präparation der Blutproben und Isolation der PBMCs, Sammlung und Analyse der Daten, Datenverarbeitung und Tabellierung der Resultate.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **10. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 11. Publikationsliste

Publikation 1: Seema Baid-Agrawal, Ralf Schindler, Petra Reinke, Adrienne Staedtler, Sunda Rimpler, Barbara Malik, Ulrich Frei, Thomas Berg, **Prevalence of occult hepatitis C infection in chronic hemodialysis and kidney transplant patients**, Journal of Hepatology, 60(5), 2014, S. 928-933

Publikation 2: Marion Muche, Thomas Berg, Sunda Rimpler, Adrienne Staedtler, Stefan Böhm, Peter Nickel, Seema Baid-Agrawal, **Low prevalence of occult hepatitis B virus infection in chronic haemodialysis and kidney transplant patients**, Liver International, 2019, 39, S. 263-270

## 12. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. Seema Baid-Agrawal für die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit bedanken. Ich weiß es sehr zu schätzen, dass sie trotz der langen Zeit stets und unermüdlich all meine Fragen beantwortet hat und ich mich immer auf ihre Unterstützung verlassen konnte.

Ich bedanke mich voller Hochachtung bei Prof. Thomas Berg für die freundliche Mitbetreuung und Bereitstellung der notwendigen Mittel und Laborstätten.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Barbara Malik für ihre kompetente Hilfe und ihren außergewöhnlichen Einsatz. Die Laborarbeit hat so viel Spaß gemacht und wurde fachlich hervorragend begleitet.

Auch möchte ich mich bei Adrienne Städtler bedanken, mit der ich viele anstrengende, aber vor allem auch schöne gemeinsame Stunden für dieses umfangreiche Projekt verbracht habe. Zu zweit konnten wir uns immer wieder gegenseitig motivieren.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Patienten, die sich so bereitwillig zur Verfügung gestellt haben, um an dieser Studie teilzunehmen und damit dieses Projekt überhaupt erst ermöglicht haben.

Martin ein sehr großes Dankeschön für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten und Unterstützung des Layouts meiner Arbeit.

Außerdem danke ich meinen lieben Kindern, Pauline und Klara, ich liebe Euch unendlich.