

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hepatologie und
Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum
und dem Institut für Medizinische Virologie, Campus Charité Mitte
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Inzidenz, Seroprävalenz, Antikörperverlauf und klinische
Epidemiologie der Hepatitis-E-Virus-Infektion bei Patienten
nach Lebertransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bahram Ramez

aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abstract	II
1 Einleitung	1
1.1 Zur Geschichte des Hepatitis-E-Virus (HEV)	1
1.2 Taxonomie des HEV	1
1.3 Genomische Struktur des HEV	2
1.4 Geographische Verteilung der HEV-Genotypen	2
1.5 Die akute HEV-Infektion	3
1.5.1 Prävalenz	3
1.5.2 Klinischer Verlauf	5
1.5.3 Serologischer Verlauf	6
1.5.4 Therapie und Immunprophylaxe der akuten HEV-Infektion	6
1.6 Die chronische HEV-Infektion	7
1.6.1 Klinischer Verlauf	7
1.6.2 Therapie	8
1.7 Diagnostik der HEV-Infektion	8
1.7.1 Molekularbiologische Diagnostik	8
1.7.2 Serologische Diagnostik	9
1.7.2.1 ELISA	9
1.7.2.2 Westernblot	10
1.7.2.3 Aviditätstestung	11
1.8 Seroprävalenz des HEV	12
1.9 Übertragungswege und Risikofaktoren	13
1.9.1 Endemische Regionen	13
1.9.2 Nichtendemische Regionen	13
1.10 Aufgabenstellung	15
2 Patienten und Methoden	16
2.1 Patientenauswahl	16
2.2 Vergleich klinischer Patientendaten zwischen den untersuchten Kohorten	17
2.3 Erhebung demographischer Patientendaten für das HEV-Infektionsrisiko in der ELISA-Kohorte (n=150)	18
2.4 Patientenbefragung und Erfassung epidemiologischer Risikofaktoren in der ELISA-Kohorte (n=150)	19
2.4.1 Demographische Daten	19

2.4.2	Tierkontakt	19
2.4.3	Essgewohnheiten	19
2.4.4	„Sonstige Risikofaktoren“	20
2.5	Datenerhebung zur Korrelation zwischen der HEV-Infektion und anderen viralen Hepatitiden in der ELISA-Kohorte (n=150)	20
2.6	Erhebung des immunsuppressiven Medikamentenschemas der anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten	21
2.7	Probenvorbereitung für die serologische und molekularbiologische Diagnostik	21
2.8	Serologische Diagnostik in der ELISA-Kohorte (n=150)	21
2.8.1	Anti-HEV IgG-ELISA	21
2.8.2	Anti-HEV IgG-Westernblot	23
2.8.3	Avidität	24
2.9	Molekularbiologische Diagnostik	25
2.9.1	RNA-Isolation	25
2.9.2	Reverse Transkription	26
2.9.3	Real-Time PCR	27
2.10	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Ergebnisse der serologischen Untersuchungen	31
3.1.1	Anti-HEV Seroprävalenz vor und im Verlauf nach OLT: qualitative Auswertung des ELISA-Screenings	31
3.1.2	Patientencharakteristika in Abhängigkeit vom anti-HEV Status	33
3.1.3	Der anti-HEV IgG-Verlauf vor und nach OLT: quantitative Auswertung des ELISA-Screenings	33
3.1.4	Die Sensitivität des HEV-ELISA's im Vergleich zum HEV-Westernblot	35
3.1.5	Antikörperverteilungsmuster der positiven HEV-Westernblots	36
3.1.6	Quantitative Auswertung der HEV-Westernblot-Ergebnisse für die zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten	37
3.1.7	Ergebnisse der Aviditätstestungen der zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten	38
3.1.8	Medikamentöse Immunsuppression der zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten	39
3.1.9	Fallbeschreibung der Patienten, die erst zu einem Zeitpunkt nach OLT anti-HEV IgG positiv getestet worden sind	40
3.1.9.1	Patient 1 – eine akute, selbstlimitierende HEV-Infektion	41
3.1.9.2	Patienten 2 und 3 – zwei Patienten mit einem positiven anti-HEV IgG-Befund zum Zeitpunkt Monat 12 nach OLT	43
3.2	Patientencharakteristika und Risikofaktoren bei anti-HEV Seropositivität	46
3.2.1	Demographische Faktoren	46

3.2.2	Prävalenz von Risikofaktoren für eine HEV-Infektion	47
3.2.2.1	Tierkontakt	49
3.2.2.2	Essgewohnheiten	49
3.2.2.3	„Sonstige Risikofaktoren“	50
3.2.3	Zusammenhang mit anderen viralen Hepatitiden – anti-HEV IgG positiv vs. negativ getestete Patienten	50
3.3	Ergebnisse des HEV-RNA-Screenings (n=406)	51
3.3.1	Patient 4 – eine chronische HEV-Infektion nach Retransplantation	52
3.4	Eine chronische HEV-Infektion durch ein infiziertes Spenderorgan bei einem Patienten, der außerhalb der PCR-Kohorte auf HEV getestet wurde	54
4	Diskussion	56
4.1	Diskussion der Ergebnisse des HEV-Antikörperscreenings	57
4.1.1	Die HEV-Seroprävalenz in einem nichtendemischen Land	57
4.1.1.1	Einfluss des serologischen Testsystems auf die Seroprävalenzrate	58
4.1.1.2	Einfluss des Wohnortes auf die HEV-Seroprävalenzrate	59
4.1.2	Die Avidität der zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Serumproben	61
4.1.3	Patienten mit Verlust von HEV-Antikörpern nach Lebertransplantation	61
4.1.4	Zum Zeitpunkt nach OLT anti-HEV IgG positiv getestete Patienten	64
4.2	Diskussion der Ergebnisse des HEV-RNA-Screenings in der PCR-Kohorte (n=406) – Inzidenz der akuten und chronischen HEV-Infektion nach OLT	65
4.3	Diskussion der Ergebnisse des epidemiologischen Fragebogens – Risikofaktoren für eine HEV-Infektion in nichtendemischen Ländern	69
4.3.1	Das Risiko einer zoonotischen Transmission	69
4.3.2	Das Risiko einer parenteralen Transmission	70
4.4	Evaluierung der Persistenz sowie des Reaktivierungsrisikos des HEV	71
5	Zusammenfassung	73
	Literaturverzeichnis	75
	Abbildungsverzeichnis	83
	Tabellenverzeichnis	84
	Anhang	85
	Eidesstattliche Versicherung	97

Lebenslauf	99
Publikationen	100
Danksagung	101

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
III NHANES	“Third National Health and Nutrition Examination Survey“
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AI	Aviditätsindex
ALT	Alanin-Aminotransferase
ALV	Akutes Leberversagen
anti-HB _c	Antikörper gegen das HBV-Core-Antigen
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BilirubinT	Gesamtbilirubin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	“Cluster of Differentiation“
CDC	“Center for disease control and prevention“
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cop	Kopien
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay“
engl.	englisch
ERC	endoskopisch retrograde Cholangiographie
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
et al.	und andere

Ew.	Einwohner
Fa.	Firma
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Gt	Genotyp
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEV	Hepatitis-E-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC	Interne Kontrolle
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
M	Monat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mmol	Millimol
mol	Mol
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
O2C	C-terminaler Teil des ORF2-Proteins
O2M	Mittelstück des ORF2-Proteins
O2N	N-terminaler Teil des ORF2-Proteins
O3	ORF3-Protein

OLT	orthotope Lebertransplantation
ONW	oberer Normwert
OR	“Odds Ratio“, Quotenverhältnis
ORF	“open reading frame“, offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s. Abb.	siehe Abbildung
SD	“standard deviation“, Standardabweichung
s.o.	siehe oben
s. Tab.	siehe Tabelle
s.u.	siehe unten / siehe unter
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TMB	Tetramethylbenzidin
U	Unit
u.a.	unter anderem
ULN	“upper limit of normal“, oberer Grenzwert
URL	“Uniform resource locator“, einheitlicher Quellenanzeiger
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Abstract (deutsch)

Einleitung: 2008 wurden erstmals chronische HEV-Infektionen bei Patienten nach Organtransplantation beschrieben. Dabei zeigten chronische Infektionsverläufe eine rasche Progredienz der viralen Hepatitis in eine Leberfibrose bzw. Leberzirrhose. In Deutschland liegen bisher nur wenige Daten zur Prävalenz der HEV-Infektion sowie zu möglichen Risikofaktoren vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Auftreten der akuten und chronischen HEV-Infektion sowie die HEV-Seroprävalenz bei Patienten nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) zu bestimmen.

Patienten und Methoden: Ein HEV-RNA-Screening wurde mittels Real-Time PCR bei 406 Patienten (durchschnittliches Alter zur OLT: 52 Jahre; 64% männlich) die zwischen 2001 und 2006 am Campus Virchow-Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin ein Lebertransplantat erhielten, zu den Zeitpunkten Monat 6 nach OLT sowie zu einem 6 Monate späteren Zeitpunkt durchgeführt. In einer Subkohorte von 150 Patienten (ELISA-Kohorte) erfolgte die Durchführung eines sequentiellen RNA- und anti-HEV IgG-Screenings zu den Zeitpunkten vor OLT sowie Monat 6, 12 und 36 nach OLT. Mit Hilfe eines selbstkonzipierten Fragebogens wurden bei Patienten der ELISA-Kohorte Risikofaktoren für den Erwerb einer HEV-Infektion erfasst.

Ergebnisse: Die in der ELISA-Kohorte (n=150) ermittelte anti-HEV IgG-Seroprävalenz betrug 21% (n=31). 28 Patienten (19%) wurden zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getestet. Hiervon blieben 20 Patienten über den gesamten Untersuchungszeitraum anti-HEV IgG positiv. 3 Patienten (2%) wurden erstmalig zu einem Verlaufszeitpunkt nach OLT anti-HEV IgG positiv getestet; Serumproben von 2 Patienten wurden im weiteren Verlauf anti-HEV IgG negativ getestet, während bei einem Patienten zu Monat 6 nach OLT HEV-RNA sowie anti-HEV IgM nachgewiesen werden konnte. HEV-RNA konnte in keiner weiteren Serumprobe der ELISA-Kohorte nachgewiesen werden. In der Gesamtkohorte wurden 2 von 406 Patienten (0,5%) HEV-RNA positiv getestet; ein Patient entwickelte einen chronischen Infektionsverlauf.

Schlussfolgerung: Die ermittelte HEV-Seroprävalenzrate von 21% verdeutlicht, dass man in Deutschland von einer höheren Exposition gegenüber HEV ausgehen muss als bisher angenommen. Das Risiko für eine akute oder chronische HEV-Infektion ist jedoch gering. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen verdeutlichen zudem die Notwendigkeit der Verbesserung der zur Verfügung stehenden serologischen Testverfahren.

Abstract (englisch)

Introduction: First reports of chronic HEV infection causing significant liver disease in immunocompromised patients such as organ transplant recipients have been published recently. Little is known about the HEV prevalence in Germany as well as relevant risk factors. The aim of our study was to evaluate the anti-HEV and HEV RNA prevalence in patients after liver transplantation (OLT).

Patients and methods: 406 patients (median age at time point of OLT: 52 years; 64% male) who underwent liver transplantation between 2001 and 2006 at the Charité Campus Virchow-Klinikum in Berlin were included in our study. Stored serum samples were analyzed for the presence of HEV RNA by real-time PCR at month 6 after OLT as well as during the last follow-up evaluation. Additionally, a close monitoring for both, anti-HEV IgG and HEV RNA, was performed in a subgroup of 150 patients prior to OLT as well as at month 6, 12, and 36 after OLT. A survey was conducted in these patients to identify possible risk factors for HEV infection.

Results: Out of the 150 patients who were systematically screened for the presence of anti-HEV and HEV RNA, 31 patients were tested positive for anti-HEV IgG indicating a seroprevalence of 21%. 28 patients (19%) were anti-HEV positive before OLT and 20 of them also remained positive for the entire observation period. HEV antibodies became detectable after OLT in further 3 patients (2%) and disappeared in 2 of them during further follow-up. In the remaining patient, HEV RNA and IgM anti-HEV antibodies could be transiently detected at month 6 after OLT. HEV RNA could not be detected in any other sample of the 150 patients, which were systemically screened. In the overall cohort (n=406), HEV RNA could be detected in 2 patients (0.5%). One patient developed chronic HEV infection defined by the presence of HEV RNA for more than six months.

Conclusion: Anti-HEV seroprevalence is high in liver transplant recipients but seems not to be a risk factor for acute or chronic HEV reactivation. However, chronic HEV infection may occur in individual cases. Furthermore, the serological results of the present study indicate the need of further evaluation of the common serological screening tests.

Einige Formulierungen sind dem Abstract "Prevalence of Hepatitis E virus infection in patients before and after liver transplantation: A single center long-term follow-up study" entommen (s.u. Publikationen).

1 Einleitung

1.1 Zur Geschichte des Hepatitis-E-Virus (HEV)

1983 wurde das Hepatitis-E-Virus (HEV) erstmals durch den russischen Virologen Mikhail Balayan mit Hilfe eines Immunelektronenmikroskops nachgewiesen [1]. Zunächst bezeichnete man das Virus als „enterically transmitted non-A non-B Hepatitis Virus“, bis es 1991 Tam et al. gelang, das Virusgenom zu klonieren und zu sequenzieren [2]. Fortan bezeichnete man den infektiösen Erreger als Hepatitis-E-Virus (HEV). Bis 2008 wurde der HEV-Infektion ausschließlich ein akuter Verlauf vergleichbar mit einer Hepatitis-A-Virus-Infektion (HAV-Infektion) zugeschrieben. Aufgrund des fäkal-oralen Transmissionsweges war die HEV-Infektion hauptsächlich in Entwicklungsländern oder bei Reiserückkehrern aus den jeweiligen endemischen Regionen von Bedeutung. Durch die Erstbeschreibung chronischer HEV-Infektionsverläufe bei Patienten nach Organtransplantation hat die Bedeutung der HEV-Infektion weltweit deutlich zugenommen [3]. Seither wurden weitere Fälle von chronischen HEV-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten wie Patienten nach Organtransplantation [4-5], HIV-infizierten Patienten [6] und Patienten mit hämatologischen Erkrankungen beschrieben [7]. Chronische Infektionsverläufe zeigten dabei häufig eine rasche Progredienz der viralen Hepatitis in eine Leberfibrose bzw. Leberzirrhose [4;8].

1.2 Taxonomie des HEV

Das HEV ist das einzige Virus des Genus Hepevirus innerhalb der Familie der Hepeviridae [9].

Es existiert nur ein Serotyp, allerdings unterscheidet man 4 für den Menschen pathogene Genotypen. Die 4 humanpathogenen Genotypen werden weiter in 24 verschiedene Subtypen unterteilt, wobei ein Buchstabe hinter dem Genotyp den Subtyp charakterisiert [10]. Beispielsweise scheinen die Subtypen 3e und 3f in Europa am häufigsten vorzukommen. Zudem existiert ein fünfter Genotyp, der endemisch bei Hühnern auftritt und nach aktuellem Wissensstand für den Menschen nicht pathogen ist [11].

1.3 Genomische Struktur des HEV

Beim HEV handelt sich um ein einzelsträngiges, unbehülltes RNA-Virus mit positiver Polarität, einer Länge von 7,2 Kilobasen (kb) und einem Durchmesser von 27-34 nm. Neben einem 3' Poly(A)-Schwanz und kurzen nicht-kodierenden Regionen am 3'- sowie 5'-Ende, setzt sich das Virusgenom aus drei offenen Leserastern (*engl.*, open reading frames, ORF's) zusammen (s. Abb. 1) [2]. Die ORF1-Region kodiert für ein Polyprotein, das posttranslational in verschiedene Nichtstrukturproteine sowie Enzyme gespalten wird, die für die Virusreplikation von Bedeutung sind [12]. Das ORF2-Gen befindet sich zwischen ORF1 und 3'-Ende des Virusgenoms und kodiert für ein Strukturprotein des Viruskapsids. Dieser Genabschnitt ist hochkonserviert und immunogen, sodass die gebildeten Antikörper einen Schutz bei erneuter Exposition bieten [12-13]. Die ORF3-Region beginnt mit dem letzten Nukleotid von ORF1 und überlappt vollständig mit dem ORF2-Genabschnitt. Es kodiert für ein kleines saures Phosphoprotein, das im Sinne eines Strukturproteins mit dem Zytoskelett des Virions assoziiert ist. Es ist für die Virusreplikation und Virusfreisetzung von Bedeutung, bietet allerdings keinen Schutz vor einer erneuten HEV-Infektion [14]. Außerdem sind zwei subgenomische RNAs beschrieben, von denen die kleinere sowohl ORF2- als auch ORF3-Proteine kodiert [15].

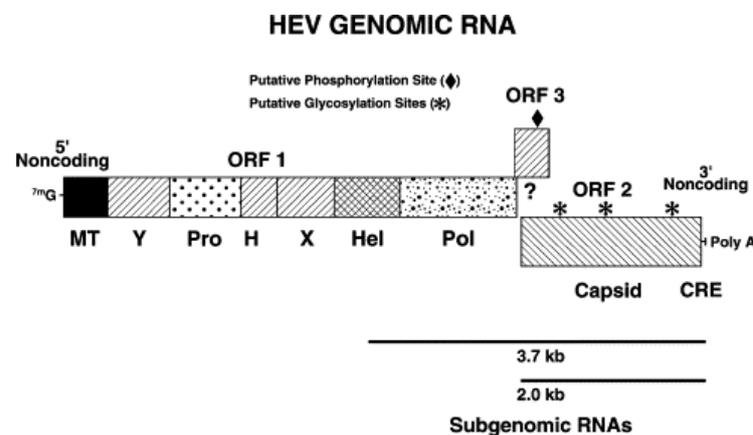


Abbildung 1: Das HEV-Genom setzt sich aus drei offenen Leserastern (ORF; *engl.*, open reading frame, ORF) zusammen. Es sind die verschiedenen Genprodukte dargestellt [9].

1.4 Geographische Verteilung der HEV-Genotypen

Die 4 verschiedenen humanpathogenen Genotypen zeigen ein spezifisches geographisches Verteilungsmuster [16]: Genotyp 1-Infektionen treten v.a. endemisch in

Entwicklungsländern Asiens und Afrikas auf. Genotyp 2-Infektionen konnten als ätiologisches Agens für eine HEV-Epidemie in Mexiko sowie nachfolgend in mehreren Ländern Zentralafrikas nachgewiesen werden [17]. Die Genotoypen 3 und 4 verursachen sporadische Infektionen. Während Genotyp 3-Infektionen weltweit vorkommen, scheinen Genotyp 4-Infektionen nur in Ländern Asiens aufzutreten [16]. Autochtone HEV-Infektionen in Industrieländern Europas sowie in den USA sind durch den Genotyp 3 verursacht.

Nicht nur in der geographischen Verteilung der Genotypen gibt es Unterschiede, sondern auch in der Transmission. Der natürliche Wirt der Genotypen 1 und 2 ist der Mensch und die Übertragung erfolgt fäkal-oral. Hingegen stellen Tiere das Hauptreservoir für die Genotypen 3 und 4 dar, sodass es sich bei der HEV-Infektion in Industrieländern um eine zoonotische Infektion handelt (näheres zu Übertragungswegen unter 1.9) [18]. Abbildung 2 verdeutlicht die Unterschiede zwischen den 4 humanpathogenen HEV-Genotypen.

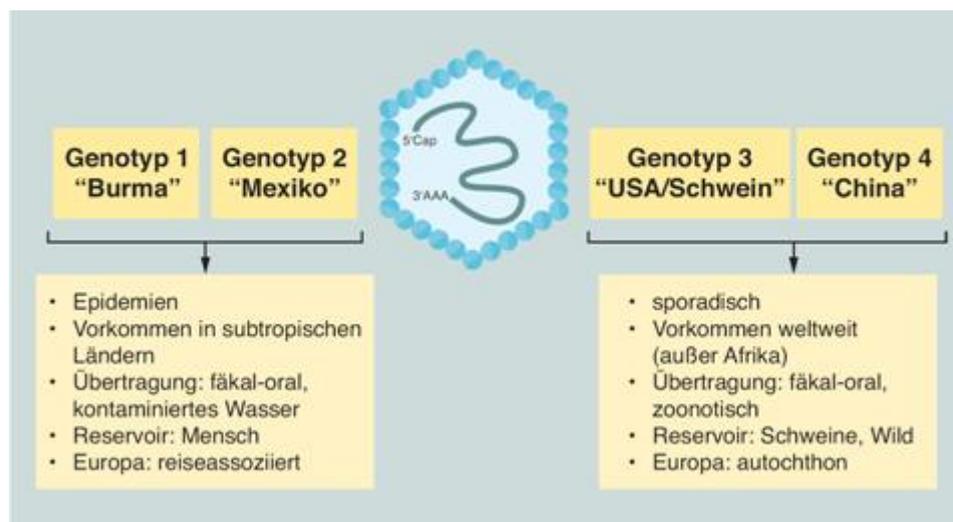


Abbildung 2: HEV-Genotypen – Übertragungswege und Infektionsquellen [19].

1.5 Die akute HEV-Infektion

1.5.1 Prävalenz

Während die HEV-Infektion in Entwicklungsländern Asiens und Afrikas endemisch auftritt, ist die Prävalenz einer diagnostizierten, akuten Infektion in Deutschland und in anderen Industriestaaten im Vergleich sehr niedrig. Die folgende Abbildung des Centers

for disease control and prevention (CDC) unterscheidet verschiedene Regionen der Erde hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens einer akuten HEV-Infektion.

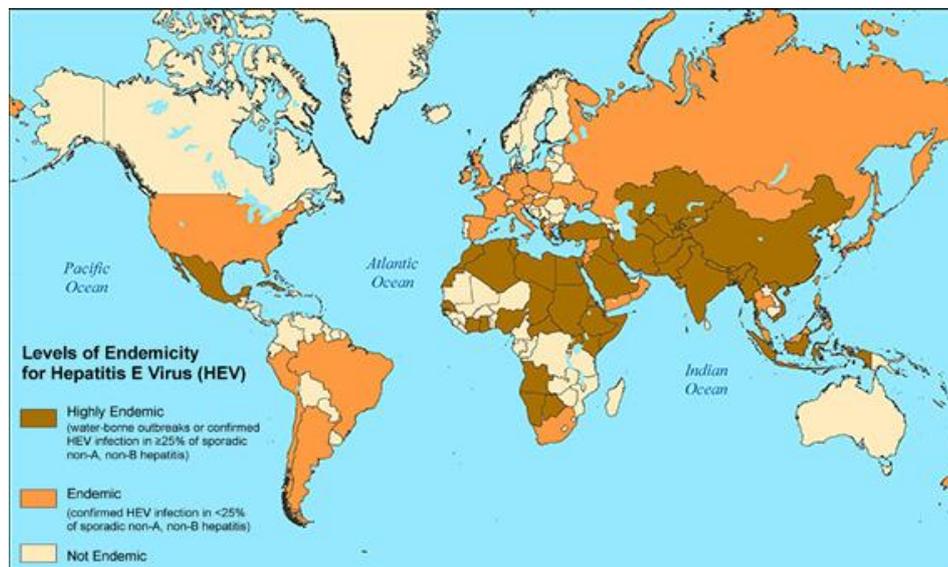


Abbildung 3: Endemieregionen für das Hepatitis-E-Virus. Quelle: Center for disease control and prevention, URL-Adresse: <http://www.cdc.gov/hepatitis/HEV/HEVfaq.htm> (abgerufen am 15.09.2009)

Eine HEV-Infektion ist in Deutschland gemäß des Infektionsschutzgesetzes eine meldepflichtige Erkrankung und aus diesem Grund erstellt das Robert-Koch-Institut jährlich Statistiken zu diagnostizierten HEV-Infektionen (s. Tab. 1). Man nahm ursprünglich an, die Mehrzahl der HEV-Infektionen stünde in Zusammenhang mit einer Reise in ein HEV-Endemiegebiet. Dass dies nicht der Fall ist, wird anhand der folgenden Tabelle demonstriert.

Tabelle 1: Anzahl gemeldeter HEV-Fälle in Deutschland, Stand 07/2010. Quelle: Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin Nummer 34, 2010, URL-Adresse: http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/reCfJag5U31Bw/PDF/225zy9Y042TIm6.pdf (abgerufen am 05.06.2011)

Meldejahr	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Anzahl an das RKI übermittelter Hepatitis-E-Fälle	53	54	51	73	104	108	114 (Januar–Juli)
davon mit Nennung von Deutschland als möglichem Infektionsort	21	23	24	45	70	85	89 (Januar–Juli)

Tab. 1: Anzahl an das RKI übermittelter Hepatitis-E-Fälle (Referenzdefinition) und der Anteil mit Nennung von Deutschland als möglichem Infektionsland nach Meldejahr, Deutschland 2004 bis Juli 2010

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, ist der Anstieg gemeldeter HEV-Fälle in den letzten Jahren am ehesten auf eine Zunahme von diagnostizierten autochtonen, d.h. im jeweiligen Land erworbenen Infektionen zurückzuführen (s. Tab. 1; Differenz aus erster

und zweiter Zeile ist über die Jahre betrachtet in etwa konstant). Interessant ist in diesem Zusammenhang außerdem die Analyse von Pischke et al., die einen gleichzeitigen Anstieg von neu gemeldeten Fällen und Publikationen zur HEV-Infektion konstatiert. Aufgrund über die Jahre konstant gebliebener Seroprävalenzraten vermutet der Autor, dass die gestiegene Anzahl neu gemeldeter HEV-Fälle in Deutschland und in anderen Industrieländern auf ein gestiegenes klinisches Bewusstsein und folglich häufigerer Diagnostik zurückzuführen ist, als auf einen wahren Inzidenzanstieg der HEV-Infektion [20].

1.5.2 Klinischer Verlauf

Die Inkubationszeit beträgt 15-60 Tage und die klinische Symptomatik der HEV-Infektion ist in seiner Ausprägung und Schwere variabel [1;21]. Bei immunkompetenten Patienten verläuft die HEV-Infektion in der Mehrzahl der Fälle klinisch stumm und ist sowohl bei subklinischem als auch klinischem Verlauf selbstlimitierend. In diesem Kontext konnte während Epidemien bei asymptomatischen Patienten, die eine HEV-Virämie zeigten, ein Anstieg der Leberenzyme beobachtet werden [22]. Bei einem klinisch symptomatischen Verlauf ist die Erkrankung durch 2 Phasen charakterisiert. Zunächst stellen sich für einige Tage Prodromalsymptome (wie Fieber, Erbrechen, Appetitlosigkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen) ein. Es folgt eine ikterische Phase, die mehrere Wochen andauern kann und mit der die Prodromalsymptomatik verschwindet. Selten kann eine HEV-Infektion einen fulminanten Verlauf mit möglichem letalem Ausgang nehmen. Dies ist besonders der Fall bei Patienten mit einer bestehenden Leberschädigung [22] sowie schwangeren Frauen. Für letztere sind Mortalitätsraten von bis zu 25% beschrieben [23].

Es gibt einige Unterschiede im klinischen Verlauf zwischen Patienten einer endemischen sowie einer nichtendemischen Region. Studien haben gezeigt, dass Patienten in nichtendemischen Regionen häufiger das männliche Geschlecht betreffen und älter sind. Außerdem beobachtete man häufiger eine bestehende Leberpathologie und einen Alkoholabusus bei Patienten mit autochton erworbenen Infektionen in nichtendemischen Ländern [25-26]. In seltenen Fällen kann sich die Erkrankung auch extrahepatisch manifestieren und z.B. mit neurologischen Symptomen oder einer Kryoglobulinämie-assoziierten Glomerulonephritis einhergehen [27-28].

1.5.3 Serologischer Verlauf

In der nachfolgenden Abbildung ist der serologische sowie laborchemische Verlauf einer akuten HEV-Infektion dargestellt.

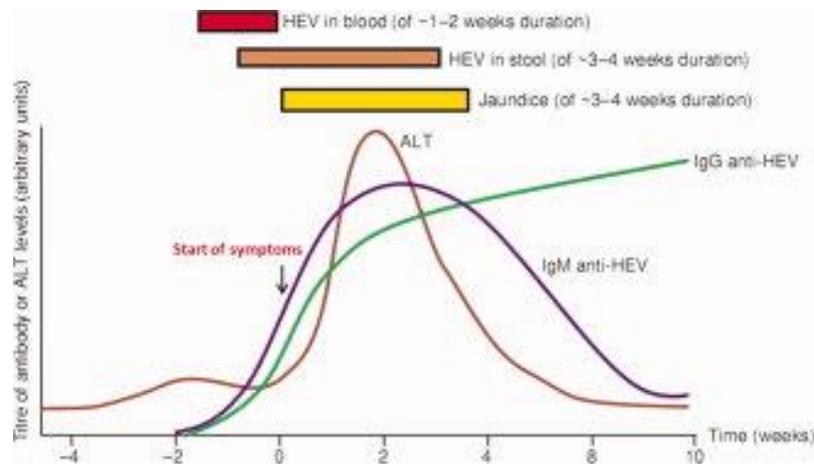


Abbildung 4: Typischer Verlauf von virusspezifischen Markern bei der HEV-Infektion [22].

Die Phase der Virämie im Blut ist kurz (1-2 Wochen) und fällt in die klinische Prodromalphase der Infektion. HEV-RNA lässt sich aber noch 2-4 Wochen nach Eintritt der klinischen Symptomatik im Stuhl nachweisen [22]. Mit Beginn der klinischen Symptomatik kommt es zum Anstieg der Lebertransaminasen. Ca. 3 Wochen nach Infektion lässt sich zunächst ein Anstieg von IgM- und kurze Zeit später von IgG-Antikörpern verzeichnen. Während anti-HEV IgM im Rahmen einer akuten Infektion nach 4-5 Monaten nicht mehr nachweisbar ist, persistieren HEV IgG-Antikörper längere Zeit und bieten in diesem Zeitraum Protektion vor erneuter Infektion. Bezüglich der Dauer der IgG-Antikörperpersistenz ist die Datenlage nicht eindeutig. Es wurde sowohl eine Antikörperpersistenz über einen Verlaufszeitraum von 14 Jahren beobachtet [29] als auch ein signifikanter Abfall des anti-HEV IgG-Titers nach 14 Monaten [30].

1.5.4 Therapie und Immunprophylaxe der akuten HEV-Infektion

Eine spezifische Therapie gegen die akute HEV-Infektion ist gegenwärtig nicht verfügbar. Im Falle einer klinischen Manifestation wird supportiv therapiert, da in den meisten Fällen die Infektion selbstlimitierend ist und folgenlos abheilt. Ein Impfstoff ist gegenwärtig noch nicht im Handel verfügbar, allerdings zeigten 2 potentielle Impfstoffe

im Rahmen einer klinischen Phase-II- bzw. III-Studie bereits erfolgversprechende Wirkungsnachweise [31-32].

1.6 Die chronische HEV-Infektion

2008 wurden von Kamar et al. erstmals chronische HEV-Infektionen bei Patienten nach Organtransplantation in Frankreich beschrieben [3]. Bei 8 von 14 Patienten ist es nach akuter Infektion zu einer länger als 6 Monate über den Infektionszeitpunkt hinaus fortbestehenden Persistenz der Virämie gekommen. Die Rate chronischer HEV-Infektionsverläufe bei Patienten mit Immunsuppression - bezogen auf alle in den jeweiligen Studien beobachteten HEV-Infektionen - wird anhand bisheriger Studien auf ca. 60% geschätzt [3;33-35]. Die Stärke der immunsuppressiven Therapie scheint in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle zu spielen, da die CD4+ Lymphozyten-Zellzahl bei den chronisch infizierten Patienten signifikant niedriger war [3]. Als weitere Risikofaktoren für einen chronischen Infektionsverlauf konnten eine immunsuppressive Therapie, die Tacrolimus beinhaltet, sowie eine niedrige Anzahl an Blutplättchen herausgestellt werden [34]. Bisher konnte ausschließlich der HEV-Genotyp 3 bei Patienten mit chronischer HEV-Infektion nachgewiesen werden. Bis zum aktuellen Zeitpunkt wurden weder chronische Genotyp 1- und 2-Infektionen noch chronische Verläufe in endemischen Regionen beobachtet.

1.6.1 Klinischer Verlauf

In der von Kamar et. al durchgeführten Studie wurden 14 Patienten nach Organtransplantation (davon 9 Patienten nach Nierentransplantation, 3 nach Lebertransplantation sowie 2 nach Nieren- und Pankreastransplantation) mit akuter HEV-Genotyp 3-Infektion beschrieben, von denen 8 einen chronischen Verlauf nahmen [3]. Bei diesen Patienten lagen erhöhte Lebertransaminasen-Werte vor, aber es sind auch einzelne Fälle beschrieben, bei denen sich die Transaminasen nach Abschluss der akuten Phase der Infektion normalisierten [4]. In der akuten Phase, sofern die Infektion klinisch apparent verläuft, gibt es keine auffälligen Unterschiede zu einem akuten, selbstlimitierenden Infektionsverlauf. Allerdings entwickelt sich bei einigen Patienten schnell eine Leberfibrose, die innerhalb weniger Jahre in eine Zirrhose übergehen kann [4;8].

1.6.2 Therapie

Aktuell gibt es keine Leitlinien-Empfehlungen zur Behandlung einer chronischen HEV-Infektion. Es ist jedoch inzwischen gut dokumentiert, dass sowohl pegyliertes Interferon [36-38] als auch Ribavirin [39-42] jeweils in einer Monotherapie effektive Therapiestrategien darstellen. Auch kann durch eine Reduktion der immunsuppressiven Therapie in ca. einem Drittel aller Fälle bereits eine Viruselimination erreicht werden [33].

1.7 Diagnostik der HEV-Infektion

Die Diagnostik einer HEV-Infektion beruht auf der serologischen Bestimmung von IgM- und IgG-Antikörpern bzw. dem Nachweis von HEV-RNA im Serum oder im Stuhl des Patienten. Eine chronische HEV-Infektion ist definiert durch den Nachweis von HEV-RNA über mindestens 6 Monate. Neben der IgG-Antikörperpersistenz wurde auch eine Persistenz von IgM-Antikörpern während der Infektionsdauer beobachtet [4].

1.7.1 Molekularbiologische Diagnostik

Der molekularbiologische Nachweis erfolgt durch Reverse Transkription und anschließender PCR-Reaktion. Eine Reverse Transkription muss zunächst durchgeführt werden, um aus der viruseigenen RNA komplementäre DNA (cDNA) herzustellen. Das Prinzip der sich anschließenden PCR-Reaktion beruht hierbei auf drei Schritten:

1. Durch hohe Temperaturen wird die zu untersuchende Doppelstrang-DNA zunächst gespalten (Denaturierung).
2. Im Anschluss binden die für die zu untersuchende Sequenz spezifischen Primer an die komplementäre Einzelstrang-DNA (Annealing).
3. Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase bindet schließlich an die Primer und liest das DNA-Segment ab (Elongation).

Dieser Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation wiederholt sich mehrmals, sodass das gesuchte Segment im Sinne einer exponentiellen Funktion amplifiziert wird. Eine Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR-Reaktion stellt die Real-Time PCR dar. Hierbei kann nicht nur qualitativ ein Genabschnitt detektiert werden, sondern dieser auch gleichzeitig durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert

werden. Der amplifizierte DNA-Abschnitt kann mit Hilfe interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt werden oder auch mit Hilfe sogenannter FRET-Sonden (Abkürzung, Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer): Hierbei wird das Donor-Fluorochrom durch eine Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil der Energie an ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom ab. Bei Zunahme des Abstandes zwischen Akzeptor und Donor nimmt das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das Fluoreszenzsignal des Donors zunimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Real-Time PCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden durchgeführt. Das Prinzip der TaqMan Real-Time PCR basiert auf der 5`-3` Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase. Bei TaqMan-Sonden handelt es sich um für die Ziel-DNA sequenzspezifische Oligonukleotide. An ihrem 5`-Ende verfügen sie über einen fluoreszenten Reporterfarbstoff (Donor-Fluorochrom) und am 3`-Ende ist ein Quencher-Farbstoff (Akzeptor-Fluorochrom) platziert. Solange die Sonde erhalten bleibt und der Quencher in räumlicher Nähe zum Reporter liegt, wird kein Fluoreszenzanstieg detektiert. Bindet jedoch die TaqMan-Sonde an die Zielsequenz und trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde, wird durch die 5`-3` Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase die Sonde hydrolysiert. Auf diese Weise werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt und die Reporter-Fluoreszenz vom Real-Time PCR-Gerät gemessen.

1.7.2 Serologische Diagnostik

Als diagnostische Verfahren der ersten Wahl werden ELISA-Testsysteme (Enzyme-linked immunosorbent assay) verwendet. Auf dem Markt gibt es kommerziell erhältliche ELISA-Testsysteme von verschiedenen Herstellern, die IgM- und IgG-Antikörper gegen ORF2- bzw. ORF3-Proteine nachweisen. In der vorliegenden Studie und in der Mehrzahl der kommerziell erhältlichen ELISA-Testsysteme werden ausschließlich Antigene des HEV-Genotyp 1 verwendet.

1.7.2.1 ELISA

Die ELISA-Testung beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung: Es werden Antikörper oder Antigen mit einem Enzym gekoppelt und die durch das Enzym katalysierte Reaktion gilt als Nachweis für das Vorhandensein des jeweiligen

Bindungspartners (Antikörper oder Antigen). Dieses Substrat wird umgesetzt und die Reaktion kann durch Farbumschlag nachgewiesen werden. Die anschließende photometrisch gemessene Signalstärke ist abhängig von der Antigen- oder Antikörper-Reaktion und erlaubt somit auch eine quantitative Aussage.

Man unterscheidet kompetitive (enzymmarkierte Antikörper und Proben-Antikörper konkurrieren um die Bindung an das Antigen) von nicht-kompetitiven ELISA. Für beide Verfahren gibt es wiederum ein direktes sowie indirektes Nachweisverfahren. Beim indirekten Verfahren binden die enzymmarkierten Antikörper nicht direkt an die mit rekombinant hergestellten Antigenen beschichtete Mikrotiterplatte, sondern an zuvor zugefügte Antikörper der zu untersuchenden Probe. In der nachfolgenden Abbildung wird das Prinzip des in dieser Arbeit durchgeführten indirekten „Sandwich-ELISA“s“ erläutert (Fa. Mikrogen).

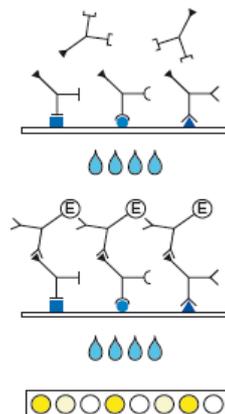


Abbildung 5: Prinzip des indirekten Sandwich-ELISA's. Rekombinante Antigene (Quadrat, Kreis und Dreieck) sind an die Festphase gebunden. Nach Inkubation mit einer verdünnten Patientenprobe binden Antikörper an die rekombinanten Antigene. Es folgen ein Waschschriff und die anschließende Zugabe enzymgekoppelter anti-HEV Antikörper. Nach erneutem Waschen wird Substrat hinzugegeben, das vom Enzym umgesetzt wird und zu einer Farbreaktion führt. Quelle: recomWell HEV IgM/IgG, Fa. Mikrogen, URL-Adresse:

<http://www.mikrogen.de/deutsch/deutschland/produkte/testsysteme/testsystem/hev-igg.html>

(abgerufen am 5.04.2011)

1.7.2.2 Westernblot

Als Bestätigungstest bei grenzwertigem ELISA-Befund dient ein Westernblot. Im Gegensatz zum ELISA werden die Antigene bei diesem Testverfahren nicht in einem Gemisch, sondern jedes Antigen wird einzeln auf einen definierten Bereich eines Teststreifens aufgetragen (s. Abb. 6). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Bezug auf die ELISA-Testung ein Westernblot-Testsystem desselben Herstellers verwendet

(recomline, Fa. Mikrogen). Auf einem Teststreifen sind hierbei sowohl Antigene des HEV-Genotyp 1 als auch des HEV-Genotyp 3 aufgetragen.

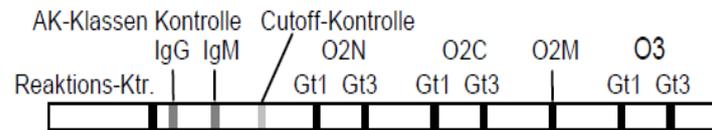


Abbildung 6: Lokalisation der rekombinanten Antigene auf dem recomline HEV-Teststreifen der Firma Mikrogen. Es sind der N- und C-terminale Teil sowie das Mittelstück des ORF2-Proteins (O2N, O2C, O2M) und das ORF3-Protein (O3) auf dem Teststreifen aufgetragen. Der Westernblot unterscheidet außerdem zwischen Genotyp 1- und Genotyp 3-Antikörpern (Gt1 und Gt3). Zusätzlich zu den Antigenen des HEV-Genoms gibt es eine Reaktionskontrolle (Reaktions-Ktr.), die sicherstellt, dass Serum zur Untersuchung aufgetragen wurde. Desweiteren verfügt jeder Teststreifen über eine Antikörper-Kontrolle (AK-Klassen Kontrolle: IgG und IgM) sowie eine Cutoff-Kontrolle. Letztere dient als Entscheidungsgrundlage zur subjektiv visuellen Bewertung der Bandenintensitäten.

Das Testprinzip des Westernblots entspricht dem des indirekten Sandwich-ELISA's. Der Vorteil gegenüber dem ELISA besteht darin, dass die verschiedenen Antikörper differenziert beurteilt werden können. Außerdem ist die Sensitivität höher und aus diesem Grund eignet sich der Westernblot als Bestätigungstest.

1.7.2.3 Aviditätstestung

Eine Aviditätstestung kann helfen, den Zeitpunkt der Infektion besser einzuschätzen. Die Avidität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen Antikörpern und Antigen. Dabei zeigen in der frühen Phase der Infektion IgG-Antikörper eine schwächere Bindung zum Antigen und die Bindungsstärke nimmt in Abhängigkeit von der Zeit nach stattgehabter Infektion zu. Für die Testdurchführung werden je zwei Blotstreifen mit derselben Serumprobe inkubiert, wobei einem der beiden Teststreifen Aviditätslösung hinzugefügt wird. Diese lässt niedrigavide Antikörper, die eher im Rahmen einer (post)akuten Infektion gebildet werden, abdiffundieren, während hochavide Antikörper gebunden bleiben. Der weitere Testverlauf entspricht dem des Westernblots, sodass am Ende die Bandenintensitäten beider Teststreifen miteinander verglichen werden können und der Aviditätsindex berechnet werden kann.

1.8 Seroprävalenz des HEV

Anti-HEV IgG-Antikörper sind ein serologischer Marker für eine stattgehabte Exposition gegenüber dem HEV. Die Seroprävalenzraten sind in der Allgemeinbevölkerung von Endemieländern hoch. Beispielsweise wurde in Ägypten eine anti-HEV Prävalenz von über 70% bei Erwachsenen beschrieben [43]. Obwohl die HEV-Infektion in Deutschland sowie auch in anderen Industrieländern eine selten diagnostizierte Erkrankung ist, liegen Studien mit nachgewiesenen hohen Seroprävalenzraten vor. Diese haben allerdings eine Spannweite von 1% [44] bis über 20% [45]. Bei Patienten nach Organtransplantation in Industrieländern variieren die Angaben zur Seroprävalenz von 3-14% [3-5]. Über die Gründe für die großen Differenzen der erhobenen Daten herrscht bisweilen Unklarheit. Vermutet wird eine große Varianz in der Güte der zur Verfügung stehenden serologischen Testsysteme [46-48]. Außerdem gibt es Belege dafür, dass es innerhalb eines Landes unterschiedlich hohe Prävalenzen von HEV-Antikörpern gibt. So unterscheiden sich Seroprävalenzraten zum einen innerhalb der verschiedenen Bundesstaaten der USA [49], als auch in Abhängigkeit von der Größe des Wohngebietes [45]. Abbildung 7 zeigt Graphiken zu Seroprävalenzen in unterschiedlichen geographischen Regionen und demonstriert die Abhängigkeit der Seroprävalenz vom steigenden Lebensalter.

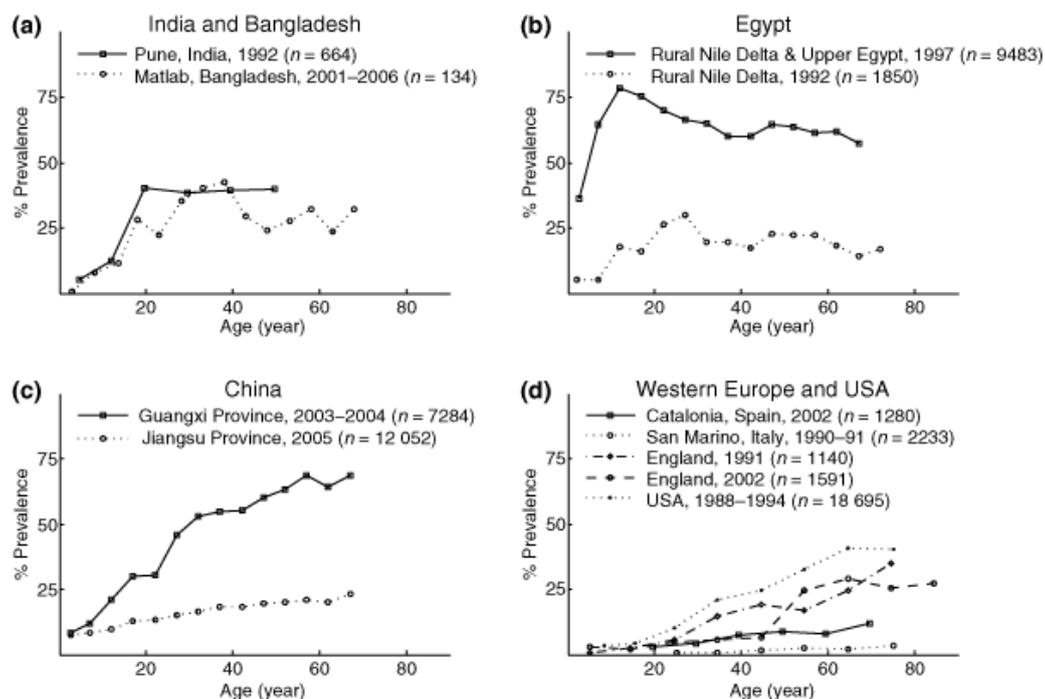


Abbildung 7: HEV-Seroprävalenzraten in verschiedenen Ländern mit zusätzlicher Abhängigkeit vom Patientenalter. In Klammern ist die Anzahl der jeweiligen Studienteilnehmer angegeben [50].

1.9 Übertragungswege und Risikofaktoren

1.9.1 Endemische Regionen

In den HEV-endemischen Entwicklungsländern wird das HEV meist fäkal-oral über kontaminiertes Trinkwasser sowie kontaminierte Nahrung übertragen. Mensch-zu-Mensch Transmissionen sind eher die Ausnahme. So geht man davon aus, dass Häufungen von Infektionen innerhalb einer Familie eher auf eine kontaminierte Wasserquelle zurückzuführen sind als auf eine Transmission zwischen Menschen [51]. Wie bereits beschrieben, handelt es sich üblicherweise um Genotyp 1- und 2-Infektionen.

Nachgewiesene Übertragungswege sind außerdem eine parenterale Infektion über Bluttransfusionen [52] sowie die vertikale Transmission des Virus bei einer Schwangeren auf ihr ungeborenes Kind [53]. Klinische Folgen für den Fetus bzw. das Neugeborene sind variabel und reichen von asymptomatischen Infektionen über eine ikterische Hepatitis bis zum intrauterinen Fruchttod [54].

1.9.2 Nichtendemische Regionen

Eine HEV-Infektion kann im Rahmen einer Urlaubsreise in eine HEV-endemische Region erworben werden. Hierbei kann es sich folglich ebenfalls um Genotyp 1- oder 2-Infektionen handeln. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich jedoch um autochtone Infektionen, d.h. im jeweiligen Land erworbene Infektionen, die durch die Genotypen 3 oder 4 verursacht sind. Da ausschließlich diese beiden Genotypen bestimmte Tierpopulationen wie z.B. Schweine infizieren können, handelt es sich nach aktuellem Wissensstand hierbei um zoonotische Infektionen [50]. Tabelle 2 (s.u.) zeigt Seroprävalenzraten bei verschiedenen Tierarten und verdeutlicht das Übertragungsrisiko durch infizierte Tiere. Dass das Virus nicht nur fäkal-oral übertragen wird, sondern im Sinne einer zoonotischen Infektion vom Tier auf den Menschen übertragen werden kann, wurde bereits in den neunziger Jahren vermutet, nachdem durch phylogenetische Analysen eine hohe Verwandtschaft zwischen porcinen und humanen HEV-Stämmen nachgewiesen werden konnte [55]. Dieser Verdacht konnte anhand weiterer Studien bestätigt werden, u.a. wurde das Auftreten einer HEV-Infektion beim Menschen nach Konsum von rohem Wildschweinfleisch und dem Verzehr von Hirschfleisch beschrieben [56-57]. Das domestizierte Schwein bzw. Wildschwein

scheint in diesem Zusammenhang aber das empfänglichste Tier für das HEV zu sein. Als Risikofaktor gilt diesbezüglich der Konsum von rohem Fleisch und v.a. von rohen Innereien. In diesem Zusammenhang beschrieben Mizuo et al. Fälle HEV-infizierter Patienten, von denen ca. 80% anamnestisch angaben, rohe Schweineleber konsumiert zu haben [58]. Auch im Rahmen der „Third National Health and Nutrition Examination Survey“ (III NHANES), einer an über 18.000 Personen in den USA durchgeführten epidemiologischen Studie, konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Konsum von Innereien und HEV-Seropositivität gezeigt werden [45]. Desweiteren wird eine Übertragung durch kontaminierte Krustentiere vermutet [59]. Auch der berufliche Kontakt mit Tieren scheint mit einem höheren HEV-Infektionsrisiko einherzugehen. Es konnte diesbezüglich ein Zusammenhang zwischen HEV-Seropositivität und Personen mit regelmäßigem Kontakt zu Schweinen gegenüber Personen ohne beruflichen Kontakt zu Schweinen aufgezeigt werden [60-62]. Zum Übertragungsrisiko durch Haustiere gibt es keine eindeutige Datenlage. Zwar konnte das Halten von Haustieren in der III NHANES als signifikanter Risikofaktor identifiziert werden [45], in der Fall-Kontroll-Studie von Wichmann et al. konnte dieser Zusammenhang allerdings nicht herausgestellt werden [63].

Außerdem kann das HEV im immunsupprimierten menschlichen Organismus reaktiviert werden. Ein solcher Fall wurde erstmals 2009 bei einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nach allogener Stammzelltransplantation beschrieben [64]. Viele dokumentierte Fälle lassen sich jedoch nicht eindeutig einem Risikoereignis zuordnen. Dass noch andere mögliche Transmissionswege existieren, erscheint daher wahrscheinlich und muss noch weiter erforscht werden.

Tabelle 2: HEV-Seroprävalenzraten bei verschiedenen Tieren aus unterschiedlichen Ländern, adaptiert nach Pavo et al. [65].

Tier	Länder	Seroprävalenz (%)
Schwein	Weltweit	30-80
Wildschwein	Japan, Frankreich, Deutschland, Italien, Spanien, Ungarn	5-42
Hirsch	Japan, Ungarn	3-34
Kaninchen	China	57
Ratte	Indien, Brasilien, USA	50-80
Pferd	China, Ägypten	13-16
Katze	Japan, Spanien	11-33
Hund	Brasilien, Spanien	7-18
Schaf	China, Spanien	2
Ziege	China, Spanien	1-24
Kuh	Brasilien, China, Indien	1-7
Huhn	USA, Australien, Ungarn	20-30
Ente	China	12,8

1.10 Aufgabenstellung

Aufgrund der neuen Erkenntnisse der letzten Jahre - v.a. das neue Wissen über die Möglichkeit eines chronischen Infektionsverlaufes - sollte die Inzidenz der HEV-Infektion bei Patienten mit Immunsuppression nach Lebertransplantation in Deutschland untersucht werden. Hierzu wurden von 406 Patienten, die zwischen 2001 und 2006 am Campus Virchow-Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin lebertransplantiert wurden, Serumproben zum Zeitpunkt Monat 6 nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) sowie zum aktuellen Zeitpunkt nach OLT mittels Real-Time PCR auf das Vorliegen von HEV-RNA untersucht. War eine Serumprobe HEV-RNA positiv, so wurde diese sequenziert und phylogenetisch analysiert.

Ein weiteres Ziel war es, die HEV-Seroprävalenzrate in einer repräsentativen Kohorte eines nichtendemischen Landes zu bestimmen sowie den HEV-Antikörperverlauf zu beobachten. Hierfür wurde mit Hilfe eines ELISA-Testsystems in einer Subkohorte von 150 Patienten ein Antikörperscreening zu definierten Zeitpunkten vor und nach OLT durchgeführt. Es wurden Patientenserum zu den Zeitpunkten vor OLT sowie Monat 6, 12 und 36 nach OLT auf das Vorliegen von anti-HEV IgG sowie HEV-RNA untersucht.

Schließlich sollten Risikofaktoren für den Erwerb einer HEV-Infektion identifiziert werden. Hierzu wurden für Patienten der ELISA-Kohorte (n=150) mit Hilfe der Patientenakten klinische sowie demographische Patientendaten erhoben und zwischen anti-HEV IgG positiv und negativ getesteten Patienten verglichen. Um weitere mögliche Risikofaktoren zu eruieren, wurde mit Hilfe eines selbstkonzipierten Fragebogens bei Patienten des ELISA-Kollektivs eine telefonische Patientenbefragung durchgeführt und die erhobenen Daten wurden wiederum zwischen seropositiv und –negativ getesteten Patienten verglichen.

2 Patienten und Methoden

2.1 Patientenauswahl

Um die Inzidenz der akuten sowie chronischen HEV-Infektion bei Patienten nach Lebertransplantation zu bestimmen, wurden Seren von 406 Patienten, die zwischen Januar 2001 und Dezember 2006 am Campus Virchow-Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin lebertransplantiert wurden, mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein von HEV-RNA untersucht. Hierfür verwendete man tiefgefrorene, archivierte Serumproben zu den Zeitpunkten Monat 6 (\pm 2 Monate) nach OLT sowie zum aktuellen Zeitpunkt nach OLT. Die Differenz zwischen den beiden Serumproben sollte 6 Monate betragen und die Patienten sollten ein Mindestalter von 18 Jahren haben. Weiterhin war es Voraussetzung, dass das Probenvolumen mindestens 500 μ l für die laborchemische Diagnostik betrug. Mit Hilfe des Labordatensystems „GLIMS“ (Göttert Software, Griesheim, Deutschland) wurde die Verfügbarkeit der Seren überprüft. Insgesamt 745 Lebertransplantationen wurden zwischen 2001 und 2006 durchgeführt. 592 Patienten erfüllten vor dem Heraussuchen der tiefgekühlten Serumproben die Einschlusskriterien; von 406 Patienten lagen verfügbare Serumproben bzw. Proben mit ausreichendem Volumen vor.

Um die Seroprävalenz von anti-HEV IgG vor und nach OLT zu bestimmen, erfolgte in einer Subkohorte von 150 Patienten ein kombiniertes Antikörper- und HEV-RNA-Screening zu den Zeitpunkten vor OLT sowie Monat 6 (\pm 2 Monate), 12 (\pm 2 Monate) und 36 (\pm 2 Monate) nach OLT. Die Patienten dieser ELISA-Kohorte (n=150) wurden zwischen Januar 2002 und Dezember 2005 lebertransplantiert. Da eine Nachbeobachtungszeit von mindestens 36 Monaten gewährleistet sein musste, konnten für die ELISA-Kohorte nur Patienten berücksichtigt werden, die spätestens im Dezember 2005 transplantiert wurden (die Datenerhebung erfolgte 2009). Die Patientenrekrutierung erfolgte nach demselben Prinzip wie für die PCR-Kohorte und es galten dieselben Einschlusskriterien.

2.2 Vergleich klinischer Patientendaten zwischen den untersuchten Kohorten

Klinische Patientendaten wurden erfasst, um diese zwischen den Patienten, welche vor dem Heraussuchen der Serumproben die Einschlusskriterien für das RNA-Screening erfüllten (n=592), den rekrutierten Patienten der PCR-Kohorte (n=406) sowie den Patienten der ELISA-Kohorte (n=150) zu vergleichen. Mit Hilfe der Transplantationsliste konnte von allen Patienten das Geburtsdatum, Transplantationsdatum, Geschlecht sowie die Grunderkrankung erfasst werden. Tabelle 3 vergleicht Alter, Geschlechterverteilung und die Grunderkrankung zwischen den 3 Patientengruppen. War ein akutes Leberversagen einer Grunderkrankung zuzuordnen, so wurde die zu Grunde liegende Pathologie als Grunderkrankung notiert. War eine pathologische Zuordnung nicht möglich, so wurde die zur Lebertransplantation führende Grunderkrankung als akutes Leberversagen unklarer Genese klassifiziert. Kombinierte Hepatitis-B- und Hepatitis-D-Infektionen wurden alle als Hepatitis-B-Infektion klassifiziert.

Es gab keine Hinweise auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Tab. 3). Die Patienten, die die Einschlusskriterien für das RNA-Screening erfüllten (n=592), hatten ein Durchschnittsalter von 50 Jahren zum Transplantationszeitpunkt; 364 (61%) waren männlich und die 3 häufigsten zur Lebertransplantation führenden Grunderkrankungen waren eine alkoholtoxische Zirrhose (29%, n=173 Patienten), eine Hepatitis-C-Virus-Infektion (HCV-Infektion; 22%, n=131) sowie eine Hepatitis-B-Virus-Infektion (HBV-Infektion; 13%, n=75).

Die untersuchten Patienten der PCR-Kohorte (n=406) waren zum Zeitpunkt der Lebertransplantation durchschnittlich 52 Jahre alt (Spannweite: 19-70 Jahre). 261 der eingeschlossenen Patienten waren Männer (64%). Die zur Transplantation führende Grunderkrankung war am häufigsten eine alkoholtoxische Leberzirrhose (32%, n=130 Patienten), bei 25% (n=101) der untersuchten Patienten eine HCV-bedingte Leberzirrhose und in 13% (n=53) der Fälle eine HBV-assoziierte Leberzirrhose.

Die Patienten der ELISA-Kohorte (n=150) hatten zum Zeitpunkt der Transplantation ein Durchschnittsalter von 51 Jahren (Spannweite: 21-70 Jahre); 63% der Patienten waren Männer (n=95). In dieser Kohorte war ebenfalls eine alkoholtoxisch bedingte Leberzirrhose mit 32% (n=48) die häufigste Ursache für die Lebertransplantation,

gefolgt von einer HBV-bedingten Leberzirrhose (n=29) sowie einer HCV-bedingten Leberzirrhose (n=28) in jeweils 19% der Fälle.

Tabelle 3: Klinische Patientencharakteristika im Vergleich zwischen den a priori für das RNA-Screening in Frage kommenden Patienten (n=592), Patienten der PCR-Kohorte (n=406) und den Patienten der ELISA-Kohorte (n=150). Verglichen werden das Alter zum Zeitpunkt der OLT, das Geschlechterverhältnis sowie die Verteilung der häufigsten zur Transplantation führenden Grunderkrankungen.

	Suchkohorte; n (%)	PCR-Kohorte; n (%)	ELISA-Kohorte; n (%)
Patientenanzahl	592	406	150
Alter zur OLT [Jahre; Mittelwert \pm SD (Spannweite)]	50 \pm 11 (18-70)	52 \pm 10 (19-70)	51 \pm 10 (21-70)
männlich / weiblich	364/228	261/145	95/55
Grunderkrankung			
Alkoholtoxische Zirrhose	173 (29,2)	130 (32,0)	48 (32,0)
HCV-Infektion	131 (22,1)	101 (24,9)	28 (18,7)
HBV-Infektion	75 (12,7)	53 (13,1)	29 (19,3)
Kryptogene Zirrhose	30 (5,1)	22 (5,4)	9 (6,0)
Primär sklerosierende Cholangitis	35 (5,9)	12 (3,0)	3 (2,0)
Primär biliäre Zirrhose	28 (4,7)	18 (4,4)	8 (5,3)
Sonstige	120 (20,3) ^a	70 (17,2) ^b	25 (16,7) ^c

Anmerkung. HBV, Hepatitis-B-Virus; HCV, Hepatitis-C-Virus; OLT, orthotope Lebertransplantation; SD, standard deviation (*engl.*, Standardabweichung).

^a Die häufigsten unter „Sonstige“ zusammengefassten Grunderkrankungen der Patienten der Suchkohorte (n=592) waren: Autoimmunhepatitis (n=17), Budd-Chiari-Syndrom (n=15), Polyzystische Lebererkrankungen (n=14), akutes Leberversagen (ALV) unklarer Genese (n=12), Cholangiozelluläres Karzinom (n=10), Morbus Wilson (n=8), Hepatozelluläres Karzinom (n=6), ALV nach Intoxikation und Oxalose (jeweils n=5), Amyloidose und Sekundär sklerosierende Cholangitis (jeweils n=4), Sekundär biliäre Zirrhose, Epitheloides Hämangioendotheliom, Morbus Osler, Metastasen bei einem Karzinoidsyndrom, Caroli-Syndrom (jeweils n=2), Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, Glykogenose Typ 1, Mukoviszidose, ALV nach Leberteilresektion, Echinokokkose, ALV nach Trauma, kongenital hepatische Fibrose, Kurzdarmsyndrom nach Mesenterialinfarkt, Kurzdarmsyndrom bei Morbus Crohn, splenorenale Gefäßanomalien (jeweils n=1).

^b Die unter „Sonstige“ fallenden Grunderkrankungen der Patienten der PCR-Kohorte (n=406) waren: Polyzystische Lebererkrankungen (n=12), Budd-Chiari-Syndrom (n=11), Autoimmunhepatitis (n=9), Cholangiozelluläres Karzinom (n=6), Morbus Wilson (n=4), Hepatozelluläres Karzinom und Sekundär sklerosierende Cholangitis (jeweils n=3), Epitheloides Hämangioendotheliom, Morbus Osler, Metastasen bei einem Karzinoidsyndrom, Amyloidose und Caroli-Syndrom (jeweils n=2), Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, Glykogenose Typ I, Oxalose, Echinokokkose und Mukoviszidose (jeweils n=1), akutes Leberversagen (ALV) nach Intoxikation (n=4), ALV nach Leberteilresektion (n=1) und ALV bei unklarer Genese (n=2).

^c Die unter „Sonstige“ zusammengefassten Erkrankungen der Patienten der ELISA-Kohorte (n=150) sind im Ergebnisteil unter 3.1.2 ersichtlich.

2.3 Erhebung demographischer Patientendaten für das HEV-Infektionsrisiko in der ELISA-Kohorte (n=150)

Um die Relevanz demographischer Risikofaktoren für eine HEV-Infektion zu bewerten, wurden von allen Patienten der ELISA-Kohorte (n=150) mit Hilfe der Patientenakten demographische Daten zum Geburtsland sowie zum Wohnort (Einwohnerzahl und Bundesland) zum Zeitpunkt der Lebertransplantation erfasst. Der Wohnort wurde in

Orte mit mehr als 100.000 Einwohnern (Großstadt), 20.000-100.000 Einwohnern (Mittelstadt) sowie weniger als 20.000 (Klein bzw. Landstadt) Einwohnern unterteilt. Anschließend erfolgte der Vergleich der gewonnenen Daten zwischen den im ELISA anti-HEV IgG positiv und negativ getesteten Patienten.

2.4 Patientenbefragung und Erfassung epidemiologischer Risikofaktoren in der ELISA-Kohorte (n=150)

Auf der Vorlage der Studie von Kuniholm et al. [45] wurde ein Fragebogen konzipiert, der retrospektiv Risikofaktoren für den Erwerb einer HEV-Infektion evaluieren sollte (der Fragebogen ist dem Anhang der Arbeit beigelegt). Der Fragebogen unterteilte sich in die Abschnitte Demographische Faktoren, Tierkontakt, Essgewohnheiten und „Sonstige Risikofaktoren“. Die Angaben bezogen sich auf den Zeitraum vor OLT. Insgesamt 123 Patienten aus dem ELISA-Kollektiv (82%) beantworteten den Fragebogen, 113 am Telefon sowie 10 Patienten in schriftlicher Form.

2.4.1 Demographische Daten

In den Fragebogen wurden demographische Daten aufgenommen, weil es einige Patientenakten gab, in denen diese nicht erfasst wurden. Hierzu zählten Informationen zum Geburtsland und zum Wohnort zum Zeitpunkt der OLT (Einwohnerzahl, Bundesland).

2.4.2 Tierkontakt

Da der HEV-Infektion in Industrieländern in vielen Fällen eine zoonotische Transmission zugrunde liegt, waren Fragen zum Tierkontakt relevant. Beim Tierkontakt wurde zwischen beruflichem Tierkontakt sowie Haustierkontakt unterschieden. Weiterhin erfolgte in Anlehnung an die Kuniholm-Studie [45] eine Untergliederung des Haustierkontaktes in die Kategorien Hund, Katze und „Sonstige“.

2.4.3 Essgewohnheiten

Zur Evaluierung des HEV-Übertragungsrisikos über den Verzehr von Fleischprodukten wurden Angaben zu Essgewohnheiten analog zur Kuniholm-Studie [45] erhoben: Daten

zum Konsum von Fleischprodukten im Allgemeinen, zum Konsum von Schweinefleisch und Schinken im Speziellen sowie zu Innereien wurden qualitativ und quantitativ erfasst. Ergänzend dazu erhob man quantitative Angaben zum alleinigen Leberkonsum sowie qualitative und quantitative Daten zum Konsum von Wild.

2.4.4 „Sonstige Risikofaktoren“

Unter „Sonstige Risikofaktoren“ fielen in Anlehnung an die Kuniholm-Studie [45] die Anzahl von Sexualpartnern bis zum Zeitpunkt der OLT, stattgehabter männlicher, homosexueller Geschlechtsverkehr sowie intravenöser Drogenkonsum. Um dem Risiko einer intravenösen Übertragung weiter nachzugehen, wurde die Frage nach stattgehabten Bluttransfusionen gestellt. Fragen zum beruflichen Abwasserkontakt sowie einer Reise in ein HEV-endemisches Gebiet sollten das Risiko einer fäkal-oralen Transmission für Menschen in Industrieländern evaluieren. Ein HEV-endemisches Land wurde nach Angabe des CDC dabei als ein Land definiert, in dem HEV-Infektionen mehr als 25% der sporadischen Non-A-non-B-Hepatitis-Infektionen ausmachten. Außerdem wurde nach regelmäßigen Tätigkeiten in einem Waldgebiet gefragt, um einen Hinweis auf eine fäkal-orale Transmission des HEV über kontaminierte Erde bzw. über den Kontakt zu wild lebenden Tieren zu bekommen.

2.5 Datenerhebung zur Korrelation zwischen der HEV-Infektion und anderen viralen Hepatitiden in der ELISA-Kohorte (n=150)

Um indirekte Hinweise auf Transmissionswege zu bekommen, erhob man für die Patienten der ELISA-Kohorte (n=150) Daten zum Vorhandensein von Antikörpern gegen HAV, HCV und das HBe-Antigen zum Zeitpunkt vor OLT aus den Patientenakten bzw. mit Hilfe des Datenerfassungsprogramms „Medvision“. (Medivision AG, Unna, Deutschland). Eine Assoziation zwischen anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten und anti-HCV positiv getesteten Patienten würde das Risiko einer intravenösen Transmission nahelegen. Eine Proportionalität mit anti-HAV positiv getesteten Patienten könnte auf einen fäkal-oralen Transmissionsweg hindeuten.

2.6 Erhebung des immunsuppressiven Medikamentenschemas der anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten

Um die Rolle der immunsuppressiven Therapie im Verlauf für die anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten zu evaluieren, wurden die immunsuppressiven Medikamentenschemata qualitativ zum Transplantationszeitpunkt sowie zum Zeitpunkt Monat 6 nach OLT notiert. Außerdem wurde zu den Verlaufszeitpunkten Monat 6, 12 und 36 nach OLT der Medikamentenspiegel des Immunsuppressivums Tacrolimus für die anti-HEV positiv getesteten Patienten erfasst und in Relation zu den im ELISA bestimmten anti-HEV IgG-Konzentrationen (U/ml) gesetzt.

2.7 Probenvorbereitung für die serologische und molekularbiologische Diagnostik

Von Patienten, die die Einschlusskriterien für die Studie erfüllten, wurden bei -20°C archivierte Serumproben herausgesucht. Die herausgesuchten Serumproben - mit einem Mindestvolumen von 500 μl - wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und kurz mit dem MS1 Minishaker (IKA GmbH, Staufen, Deutschland) gevortext. Anschließend pipettierte man ca. 250 μl mit einer 3,5 ml Transferpipette (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt AG & Co) und fro die Originalserumprobe wieder bei -20°C ein. Für die serologischen sowie molekularbiologischen Untersuchungen verwendete man das Aliquot und entnahm 10 μl für die ELISA-Testdurchführung. Mit dem restlichen Volumen führte man zeitgleich die RNA-Aufbereitung für die molekularbiologische Diagnostik durch. Nach Vorliegen der ELISA-Ergebnisse erfolgten das Wiederauftauen der jeweiligen, bei -20°C eingefrorenen Serumproben und die Durchführung der Westernblot- sowie Aviditätstestungen.

2.8 Serologische Diagnostik in der ELISA-Kohorte (n=150)

2.8.1 Anti-HEV IgG-ELISA

Um eine frühere Exposition gegenüber dem HEV nachzuweisen, wurde mittels ELISA ein anti-HEV IgG-Screening zum Zeitpunkt vor OLT [Monate; Mittelwert \pm SD (Spannweite)] [$3,8 \pm 6,8$ (0-34)] durchgeführt. Zusätzlich wurde der Antikörperverlauf zu

den Zeitpunkten Monat 6 [$5,6 \pm 0,7$ (4-8)], Monat 12 [$11,5 \pm 0,6$ (10-14)] und Monat 36 [$35,6 \pm 0,6$ (34-38)] nach OLT beobachtet.

Die HEV IgG-Antikörperbestimmung erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Testkits (recomWell HEV IgG/IgM, Mikrogen GmbH, Neuried, Deutschland) nach dem Prinzip eines indirekten Sandwich-ELISAS (s.u. 1.7.2.1). Die Mikrotiterplatte enthielt 96 Vertiefungen (92 für die zu untersuchenden Serumproben, jeweils eine für die Positiv- und Negativkontrolle und 2 für die Cutoff-Kontrolle) und war ausschließlich mit rekombinanten Antigenen des Genotyp 1 beschichtet. Das ORF3-Protein (O3) war komplett aufgetragen, während vom ORF2-Protein nur der C- und N-terminale Teil (O2C und O2N) auf der Platte aufgetragen waren. Jede Vertiefung der Platte wurde mit einer 1:101 verdünnten Patientenprobe (10 µl Serum in jeweils 1 ml gebrauchsfertigem Verdünnungspuffer) behandelt und eine Stunde lang bei 37°C im Wärmeschrank BR 6000 (Heraeus Instruments GmbHs, Hanau, Deutschland) inkubiert.

Verdünnungspuffer: Enthält Protein, Detergenz und blauen Farbstoff, Konservierungsmittel: Methylisothiazolon (0,01%) und Oxypurion (0,1%)

Im Anschluss folgte ein Waschschrift im ELISA-Plattenwasher Columbus (Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland), bei dem jede Vertiefung 4 Mal mit dem vorbereiteten Waschpuffer gewaschen wurde. Das Waschpufferkonzentrat wurde 1 + 9 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

Waschpufferkonzentrat: Enthält Phosphat-Puffer, Natriumchlorid, Detergenz, Konservierungsmittel: Methylisothiazolon (0,01%) und Oxypurion (0,1%)

Während des zweiten Inkubationsschrittes wurde mit Hilfe einer Multipipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in jede Vertiefung 100 µl Peroxidase-konjugierter Kaninchen anti-human IgG-Antikörper pipettiert, anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation der Platte bei 37°C im Wärmeschrank BR 6000 und ein zweiter Waschschrift, der dem ersten Waschschrift identisch war. Im Anschluss wurde jede Vertiefung mit 100 µl gebrauchsfertiger TMB-Lösung (Tetramethylbenzidin) versetzt, welche die Immunreaktion zwischen HEV-Antigen und Serumantikörpern sichtbar machte.

TMB-Substratlösung: Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (gebrauchsfertig)

Nach einer halbstündigen Inkubation der Platte bei Raumtemperatur und Lichtschutz wurde die Farbreaktion durch Pipettieren von 100 µl gebrauchsfertiger Stopplösung (Phosphorsäure-haltig) pro Kavität beendet und die Extinktionen im vollautomatischen Sunrise-Mikroprozessor-gesteuerten Mikroplatten-Photometer (Tecan GmbH) unter Verwendung der Datenreduktionssoftware Magellan (Tecan GmbH) gemessen.

Stopplösung: 24,9% Phosphorsäure

Das ELISA-Ergebnis war bei anti-HEV IgG-Konzentrationen von ≥ 24 U/ml als positiv und bei Werten ≤ 20 U/ml als negativ zu bewerten. Ein Ergebnis zwischen 20 und 24 U/ml lag im Cutoff-Bereich (Grenzwert-Bereich).

Analog zur anti-HEV IgG-Bestimmung erfolgte die anti-HEV IgM-Bestimmung, die bei Patienten mit einer akuten HEV-Infektion durchgeführt wurde (bei Nachweis von HEV-RNA), nur dass anstelle von anti-human IgG-Antikörpern IgM-Antikörper verwendet wurden.

2.8.2 Anti-HEV IgG-Westernblot

Aufgrund der höheren Sensitivität und Spezifität war ein Westernblot indiziert, wenn ein anti-HEV IgG-Ergebnis im Cutoff-Bereich (Grenzwert-Bereich des ELISA: 20-24 U/ml) lag. Außerdem wurde bei allen Patienten, die schon zum Zeitpunkt vor OLT im ELISA positiv auf anti-HEV IgG getestet wurden, ein Westernblot durchgeführt. Von Patienten, deren Serumproben ausschließlich vor OLT im ELISA anti-HEV IgG positiv waren, wurde zusätzlich zu den Zeitpunkten Monat 6 und Monat 12 nach OLT ein Westernblot durchgeführt.

Die IgG-Antikörperbestimmung mittels Westernblot erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Testkits nach dem Protokoll des Herstellers (recomBlot HEV IgG, Mikrogen GmbH, Neuried, Deutschland). Es wurde der Auto-LIA II – Automat (Innogenetics GmbH, Heiden, Deutschland) im für den Test spezifisch programmierten Modus verwendet sowie Teststreifen, die mit rekombinant hergestellten Antigenen verschiedenen Ursprungs (N- und C-terminaler Teil sowie Mittelstück des ORF2-Proteins, ORF3-Protein) aus zwei unterschiedlichen Genotypen (Genotyp 1 und 3) beschichtet waren (s. Abb. 6 unter 1.7.2.2). In jeweils eine Schale einer Inkubationswanne wurden 20 µl einer Serumprobe zu 2 ml Verdünnungspuffer (Verdünnung 1 + 100) pipettiert, eine Stunde lang inkubiert und anschließend 3 mal mit

jeweils 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer gewaschen (Waschpufferkonzentrat sowie Verdünnungspuffer sind identisch mit denen, die für den ELISA verwendet wurden). Der gebrauchsfertige Waschpuffer setzte sich für einen eingesetzten Teststreifen folgendermaßen zusammen:

0,1 g Magermilchpulver, 2 ml Waschpuffer-Konzentrat, 18 ml deionisiertes Wasser

Nach jedem Waschvorgang wurde der Waschpuffer abgesaugt und anschließend jedem Teststreifen Peroxidase konjugierter Kaninchen anti-human IgG-Antikörper hinzugefügt. Die Konjugatlösung für einen Teststreifen setzte sich dabei folgendermaßen zusammen:

20 µl IgG-Konjugat-Konzentrat + 2 ml des gebrauchsfertigen Waschpuffers

Es folgte eine 45-minütige Inkubation. Nach erneutem Waschen (s.o.) fügte man jedem Ansatz 1,5 ml Substratlösung (derselbe wie beim ELISA) zu, sodass sich positive Banden färbten. Die nun folgende Inkubation dauerte ca. 8 Minuten und die Farbreaktion wurde beendet, sobald die Cutoff-Kontrollbande sichtbar war. Hierfür wurde die Substratlösung mit Hilfe einer 3,5 ml Transferpipette (Sarstedt AG & Co) abgesaugt und die Streifen mit deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend nahm man die Teststreifen mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser und legte sie zum Trocknen für ca. 2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähiges Papier.

Es wurden die Farbintensitäten der jeweiligen Banden mit der Cutoff-Kontrolle verglichen, Punkte nach einem vom Hersteller vorgegebenen Schema für jede Antigenbande ermittelt und anschließend zu einem Gesamtwert addiert (Tabellen sind dem Anhang der Arbeit beigelegt). Der Blot war bei einem Ergebnis von ≥ 4 Punkten als positiv und bei einem Ergebnis von ≤ 2 Punkten als negativ zu bewerten. Ein Ergebnis von 3 Punkten wäre als grenzwertig zu verstehen gewesen.

2.8.3 Avidität

Mit Hilfe von Aviditätstestungen sollte von Proben, die schon zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv waren, eine Abschätzung des Infektionszeitpunktes erfolgen.

Dabei wurde das Ergebnis des Westernblots als Referenz genommen. Die Testdurchführung geschah analog zum Blotverfahren mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Aviditätslösung (Aviditätsreagenz, Mikrogen GmbH). Man fügte das

Aviditätsreagenz unmittelbar vor dem 2. Waschschrift jedem Ansatz zu, sodass leicht gebundene Antikörper, die eher im Rahmen einer (post)akuten Infektion gebildet werden, herausgewaschen wurden. Die weiteren Schritte waren denen des Westernblots identisch. Der Aviditätsindex (AI) berechnete sich aus dem Quotienten des Blotergebnisses, das mit dem Aviditätsreagenz und aus dem dazugehörigen Blotergebnis, das ohne Aviditätsreagenz behandelt wurde:

$$\text{AI} = \text{Blotergebnis mit Aviditätsreagenz} / \text{Blotergebnis ohne Aviditätsreagenz}$$

Ein Ergebnis $\leq 0,5$ könnte auf eine niedrige Avidität hinweisen und somit möglicherweise auf eine frische Infektion (Gebrauchsinformationsheft, Fa. Mikrogen, Aviditätsreagenz, Version des Jahres 2005, S. 3).

2.9 Molekularbiologische Diagnostik

Um eine akute und ggf. chronische HEV-Infektion zu diagnostizieren, wurde ein HEV-RNA-Screening von 406 Patienten zu den Zeitpunkten Monat 6 nach OLT [Monate; Mittelwert \pm SD (Spannweite)] $[5,6 \pm 0,7 (4-8)]$ sowie zum aktuellen Zeitpunkt nach OLT $[49,2 \pm 21,5 (9-96)]$ durchgeführt. Der durchschnittliche Abstand zwischen der Serumprobe zu Monat 6 und der aktuellen Serumprobe betrug für diese Kohorte ($n=406$) 43 Monate $[\pm 21,5 (5-90)]$. Erfolgte in einer Serumprobe der HEV-RNA-Nachweis, so wurden alle weiteren verfügbaren Serumproben des jeweiligen Patienten auf HEV-RNA getestet.

2.9.1 RNA-Isolation

Um in positiven Proben vorhandene virale RNA nachzuweisen, musste zunächst RNA aus dem Patientenserum isoliert werden. Die RNA-Isolation erfolgte unter Einsatz des QIASymphony Virus Mini Kit's (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) vollautomatisch mit dem QIASymphony SP unter Verwendung des cellfree 200 Protokolls (Qiagen GmbH). Hierfür verwendete man die Serumaliquots, die anfangs in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert wurden (s.o.) und stellte die Proben mit den entsprechenden Reagenzien nach dem Protokoll des Herstellers in den QIASymphony-Automaten. Die RNA-Isolation erfolgte durch Magnetpartikel-Technologie:

1. Zunächst wurde die Serumprobe lysiert.
2. Anschließend kam es zur Bindung der RNA an die Oberfläche der Magnetkügelchen.
3. Es folgte ein Waschschrift.
4. Schließlich wurde die RNA von den Magnetkügelchen abgelöst.

Pro Durchlauf wurden 24 Proben aufbereitet. Das Elutionsvolumen für eine 200 µl Serumprobe betrug 85 µl, und die gewonnenen Eluate wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.9.2 Reverse Transkription

Im Anschluss wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. In einem 0,5 ml Safe Seal PCR-Reaktionsgefäß (Sarstedt AG & Co) wurden pro Ansatz 10 µl RNA verwendet (die restliche RNA wurde bei -80°C eingefroren) und 10 µl des Reaktionsmixes hinzupipettiert. Für die Umschreibung von 25 Proben setzte sich der Reaktionsmix folgendermaßen zusammen:

Nuklease-freies Wasser (Fa. Promega, Mannheim, Deutschland)	22,5 µl
5x RT-Puffer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)	100 µl
DTT (0,1 mol/l) (Invitrogen GmbH)	2,5 µl
dNTP Mix (2,5 mmol/l je Nukleotid) (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland)	75 µl
Random Primer (600 ng/µl) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)	12,5 µl
RNAse Inhibitor (40 U/µl) (Roche Diagnostics GmbH)	25 µl
SuperScript III (200 U/µl) (Invitrogen GmbH)	12,5 µl

Die Reverse Transkription wurde im Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Bei 25°C lagerten sich innerhalb von 5 Minuten die Random Primer an den komplementären RNA-Abschnitt an. Anschließend erfolgte die Reverse Transkription bei 50°C für 35 Minuten und es folgte eine Inaktivierung der SuperScript III bei 96°C für 2 Minuten. Die

synthetisierte cDNA-Probe wurde auf 4°C heruntergekühlt und konnte bis zur späteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren werden.

2.9.3 Real-Time PCR

Die cDNA-Proben wurden nun im Rahmen der PCR amplifiziert. Dabei handelte es sich um eine Real-Time PCR unter Verwendung von FRET-Sonden (TaqMan-Sonden). Das Testprinzip ist in der Einleitung unter 1.7.1 beschrieben.

Folgende Primer (BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Deutschland) und Sonden (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Deutschland) wurden verwendet:

Amplifikationsbereich: ORF1-Protein; GenBank-Zugangsnummer: NC.001434

Sense Primer HE 1: 5`-CCG BGT TGT SAT TGA YGA GGC-3` (nt 3075-3105)

Antisense Primer HE 3: 5`-TTY GGG TCR CCR AGR AGR TGG AC-3` (nt 3170-3148)

Sonde HE 5F: 5`-FAM-CAC ATG CAG CGG GC-MGB-3` (nt 3127 – 3140)

Sonde LM 1DY (für interne Kontrolle): 5`-DYXL-ACC TTA CCG AAA TCG GTA CGG ATA CCG C-BHQ2

Man ging nach dem Protokoll des Herstellers unter Verwendung des LightCycler® FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe-Testkits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) vor. 1 ml Primer-Sonden-Mix (bei -20°C gelagert) setzte sich dabei folgendermaßen zusammen:

Nuklease-freies Wasser	870 µl
HE 1 (sense Primer)	25 µl (2,5 µmol/l im Primer-Sonden-Mix)
HE 3 (antisense Primer)	75 µl (7,5 µmol/l im Primer-Sonden-Mix)
HE 5F (Sonde)	15 µl (0,75 µmol/l im Primer-Sonden-Mix)
LM 1 DY (Sonde für interne Kontrolle)	15 µl (0,75 µmol/l im Primer-Sonden-Mix)

Der Lightcycler-PCR-Reaktionsmix für einen Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Nuklease-freies Wasser	8 µl
Primer-Sonden-Mix	4 µl
Polymerase-Mix (3,5 mmol/l MgCl ₂)	4 µl

Der Polymerase-Mix wurde, wie vom Hersteller angegeben, durch Mischen von einem Reaktionsgefäß Enzym mit 3 Reaktionsgefäßen Reaktionsmix in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß hergestellt. Anschließend pipettierte man für jede Probe 2 µl cDNA, 2 µl Interne Kontrolle und 16 µl des Lightcycler-PCR-Reaktionsmix in eine 20 µl Lightcycler-Kapillare (Roche Diagnostics GmbH). Pro Lauf wurden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt:

Positivkontrolle: Ein verdünntes Plasmid (10 Kopien/µl -> 20 Kopien im PCR-Ansatz)

Negativkontrolle: fötales Kälberserum (Fa. Perbio, Bonn, Deutschland)

Interne Kontrolle: Ein verdünntes Plasmid (50 Kopien/µl -> 100 Kopien im PCR-Ansatz)

Das Karusell (Roche Diagnostics GmbH) mit den Lightcycler-Kapillaren wurde in der Lightcycler-Zentrifuge (Roche Diagnostics GmbH) für ca. 15 Sekunden bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation nach dem Lightcycler-Standardprogramm unter optimierten Bedingungen mit dem LightCycler-Instrument 2.0 (Roche Diagnostics GmbH). Es wurde eine 2-Schritt-PCR (Annealing- und Elongations-Schritt bei gleicher Temperatur) durchgeführt:

Aktivierung der Taq-Polymerase (1 Zyklus)	10 Minuten bei 95°C
Amplifikation (55 Zyklen, 2-Schritt-PCR)	
Denaturierung	10 Sekunden bei 95°C
Annealing und Elongation	30 Sekunden bei 60°C
Kühlen (1 Zyklus)	30 Sekunden bei 40°C

Die Nachweisgrenze lag bei 3500 Kopien/ml Patientenprobe (10 Kopien im PCR-Ansatz). Um ein positives Ergebnis zu verifizieren sowie das Ausgangsprodukt für die anschließende Sequenzierreaktion zu gewinnen, führte man mit der jeweiligen cDNA-Probe eine nested PCR im Thermocycler GeneAmp 2400 (Applied Biosystems GmbH) durch. Zur Überprüfung des gewonnenen Amplifikates diente eine elektrophoretische Auftrennung in einem 2,5%-igen Agarosegel. Anschließend wurde die spezifisch erscheinende Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten und die DNA nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des Invisorb Fragment CleanUp Kit's (Fa. Invitex, Berlin, Deutschland) aus dem Gel extrahiert. Die Probe wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung des BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit's (Applied Biosystems GmbH) und 21M13 Universalprimern (Bestandteil des BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit's) im Thermocycler GeneAmp 2400 amplifiziert. Die anschließende Analyse erfolgte im 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems GmbH). Die Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte unter Verwendung der Software Vector NTI® (Invitrogen GmbH) und der Sequenzabgleich mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Datenerfassungs- und Statistikprogramms SPSS (Version 18.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

Die Prävalenz von HEV-RNA in der PCR-Kohorte (n=406) sowie die anti-HEV IgG-Seroprevalenz in der ELISA-Kohorte (n=150) wurden prozentual bestimmt. Außerdem berechnete man die Seroprevalenzraten zum Geschlecht, zu den häufigsten Grunderkrankungen sowie zu den verschiedenen demographischen und epidemiologischen Risikofaktoren. Für die jeweiligen Variablen erfolgte ein Vergleich der Seroprevalenzraten durch die Berechnung von Odds Ratios (OR; *engl.*, Quotenverhältnis); unter Einsatz des Chi-Quadrat-Tests wurden statistisch signifikante Unterschiede herausgestellt. Das Signifikanzniveau wurde hierbei und bei allen weiteren statistischen Tests bei $p < 0,05$ festgelegt.

Um einen möglichen proportionalen Zusammenhang zwischen anti-HEV IgG-Konzentrationen im ELISA und der Punktesumme der Antigenbanden im Westernblot nachzuweisen, wurden diese beiden Parameter in einem kartesischen Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen.

Alle Datensätze wurden als Mittelwert \pm der Standardabweichung des Mittelwertes ausgewiesen. Die erhobenen Datensätze wurden durch Anfertigung eines Histogramms sowie Bestimmung der Schiefe auf Normalverteilung überprüft (bei Normalverteilung lag die Schiefe zwischen +1 und -1). Die meisten Datensätze zeigten jedoch keine Normalverteilung auf. Infolgedessen wurde zwischen den verschiedenen Untergruppen der ELISA-Kohorte das Vorhandensein einer statistischen Signifikanz unter Einsatz des parameterfreien Mann-Whitney-U-Tests getestet. Um innerhalb einer Untergruppe im Zeitverlauf auf statistisch signifikante Unterschiede zu testen, wendete man den parameterfreien Wilcoxon-Test an. Bei Normalverteilung der Daten wurden vorhandene statistisch signifikante Unterschiede unter Einsatz des t-Tests herausgestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen

3.1.1 Anti-HEV Seroprävalenz vor und im Verlauf nach OLT: qualitative Auswertung des ELISA-Screenings

Bei 150 Patienten (ELISA-Kohorte) erfolgten ein HEV-Antikörperscreening sowie ein HEV-RNA-Screening zu definierten Zeitpunkten vor und nach OLT. Mit Hilfe der ELISA-Testung wurde die anti-HEV IgG-Seroprävalenz und somit eine Exposition gegenüber HEV zu den Zeitpunkten vor OLT sowie Monat 6, 12 und 36 nach OLT bestimmt. Wie den Abbildungen 8 und 9 zu entnehmen ist, wurden insgesamt 31 Patienten im Verlauf der Versuchsreihe zu mindestens einem Zeitpunkt positiv auf anti-HEV IgG getestet. Dies entspricht einer Seroprävalenzrate von 21%.

28 Patienten (19%) hatten schon vor OLT einen positiven anti-HEV IgG-Befund. Von diesen wiesen 20 Patienten (13%) zu allen weiteren Zeitpunkten nach OLT anti-HEV IgG positive Serumproben auf. 7 Patienten (5%) hatten ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT eine im ELISA anti-HEV IgG positive Serumprobe und wurden nach OLT anti-HEV IgG negativ getestet. Ein Patient, dessen Serumproben zum Zeitpunkt vor OLT sowie Monat 6 und Monat 12 nach OLT anti-HEV IgG positiv waren, wurde zum Zeitpunkt Monat 36 seronegativ getestet. Bei keinem der 28 anti-HEV IgG positiven Patienten konnte HEV-RNA mittels PCR in den untersuchten Serumproben nachgewiesen werden.

Zusätzlich gab es 3 Patienten (2%), die zum Zeitpunkt vor OLT einen negativen anti-HEV IgG-Befund aufwiesen, jedoch zu mindestens einem Verlaufszeitpunkt nach OLT anti-HEV positiv getestet wurden. Die Serumprobe eines Patienten war vor OLT anti-HEV IgG negativ und ab Monat 6 seropositiv. Für diesen Patienten konnte eine akute Infektion nachgewiesen werden. Die übrigen 2 Patienten wurden ausschließlich zu Monat 12 nach OLT seropositiv getestet, ohne dass zu einem Untersuchungszeitpunkt der Nachweis von HEV-RNA oder anti-HEV IgM gelang. Eine detaillierte Fallbeschreibung für diese 3 Patienten ist unter 3.1.9 dargestellt.

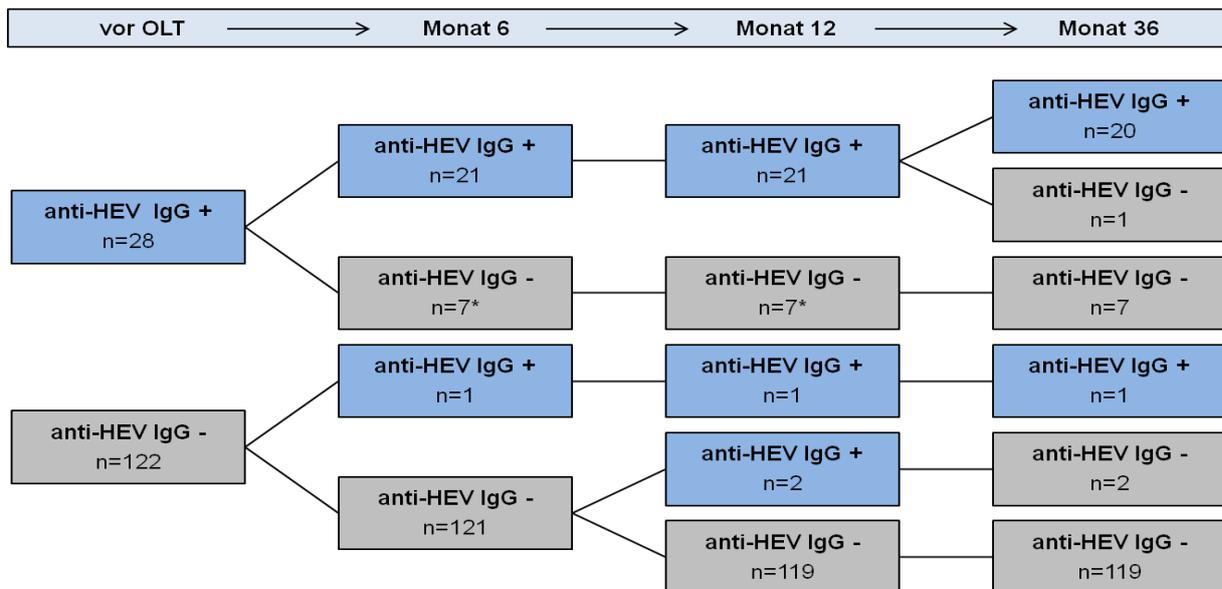


Abbildung 8: Ergebnis des anti-HEV IgG-Screenings in der ELISA-Kohorte (n=150) in Form eines Flussdiagramms. Dargestellt sind die anti-HEV IgG-Ergebnisse zu den Zeitpunkten vor orthotoper Lebertransplantation (OLT) sowie Monat 6, 12 und 36 nach OLT. Insgesamt 31 Patienten wurden anti-HEV IgG positiv getestet (20,7%).

* Von den ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT im ELISA anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (n=7), wurden 6 Patienten zum Zeitpunkt Monat 6 im Westernblot anti-HEV IgG positiv getestet und 5 Patienten zum Zeitpunkt Monat 12 nach OLT.

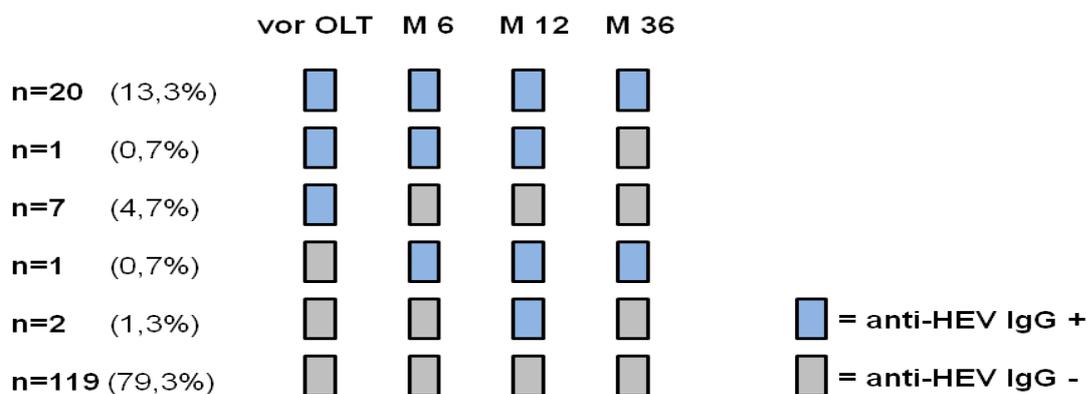


Abbildung 9: Ergebnis des anti-HEV IgG-Screenings in Form von graphischen Mustern. 31 von 150 Patienten wurden zu mindestens einem Zeitpunkt anti-HEV IgG positiv getestet (20,7%). Hiervon 20 Patienten zu allen Untersuchungszeitpunkten und 7 ausschließlich vor orthotoper Lebertransplantation (OLT). Zwei Patienten wurden nur zu Monat (M) 12 nach OLT anti-HEV IgG positiv getestet und ein weiterer Patient zu allen Zeitpunkten außer zu Monat 36 nach OLT. Ein Patient wurde, aufgrund einer nachgewiesenen akuten HEV-Infektion nach OLT, ab Monat 6 positiv für anti-HEV IgG getestet. In Klammern sind die Prozentzahlen, bezogen auf die n=150 umfassende ELISA-Kohorte, angegeben.

3.1.2 Patientencharakteristika in Abhängigkeit vom anti-HEV Status

Klinische Patientendaten wurden erhoben, um diese in der ELISA-Kohorte (n=150) zwischen den anti-HEV IgG positiv und negativ getesteten Patienten zu vergleichen. Das Alter, das Geschlechterverhältnis und die Genese der Lebererkrankung waren in der Gruppe der anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (n=31) nicht signifikant unterschiedlich zu den anti-HEV IgG negativ getesteten Patienten (n=119; s. Tab. 4).

Tabelle 4: Patientencharakteristika der ELISA-Kohorte (n=150) sowie Unterteilung in anti-HEV IgG negativ (n=119) und positiv (n=31) getestete Patienten. Für die jeweilige Grunderkrankung ist in Klammern die zugehörige Prozentzahl angegeben.

	ELISA-Gesamtkohorte	anti-HEV IgG negativ	anti-HEV IgG positiv
Patientenanzahl	150	119	31
Alter zur OLT [Jahre; Mittelwert ± SD (Spannweite)]	51 ± 10 (21-70)	51 ± 10 (21-68)	52 ± 10 (27-70)
männlich / weiblich	95/55	74/45	21/10
Grunderkrankung			
Alkoholtoxische Zirrhose	48 (32,0)	37 (31,1)	11 (35,5)
HBV-Infektion	29 (19,3)	21 (17,6)	8 (25,8)
HCV-Infektion	28 (18,7)	24 (20,2)	4 (12,9)
Kryptogene Leberzirrhose	9 (6,0)	6 (5,0)	3 (9,7)
Primär biliäre Zirrhose	8 (5,3)	8 (6,7)	
Sonstige ^a	28 (18,7)	23 (19,3)	5 (16,1)

Anmerkung. HBV, Hepatitis-B-Virus; HCV, Hepatitis-C-Virus; OLT, orthotope Lebertransplantation; SD, standard deviation (*engl.*, Standardabweichung).

^a Die Grunderkrankungen, die in der ELISA-Gesamtkohorte (n=150) unter „Sonstige“ fielen, waren: Polyzystische Lebererkrankungen (n=6; davon ein Patient anti-HEV IgG positiv), Budd-Chiari-Syndrom (n=5), Primär sklerosierende Cholangitis (n=3; davon ein Patient anti-HEV IgG positiv), Sekundär sklerosierende Cholangitis (n=3; davon ein Patient anti-HEV IgG positiv), Cholangiozelluläres Karzinom (n=2), Autoimmunhepatitis (n=2), Hämochromatose (n=1; dieser Patient war anti-HEV IgG positiv), akutes Leberversagen bei Intoxikation (n=1; dieser Patient war anti-HEV IgG positiv), Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, Hepatozelluläres Karzinom, Morbus Osler, Epitheloides Hämangioendotheliom, Glykogenose Typ 1 (jeweils n=1).

Keiner der Faktoren unterschied sich signifikant zwischen den anti-HEV positiv und negativ getesteten Patienten.

Im Folgenden werden Patienten, die durchgehend anti-HEV IgG positiv getestet wurden (n=20), als Gruppe 1 bezeichnet und Patienten, deren Serumproben ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv waren, als Gruppe 2 (n=7).

3.1.3 Der anti-HEV IgG-Verlauf vor und nach OLT: quantitative Auswertung des ELISA-Screenings

Um den Antikörpertiter im zeitlichen Verlauf beurteilen zu können, erfolgte die Auswertung der im ELISA bestimmten anti-HEV IgG-Konzentrationen (U/ml) für die

durchgehend seronegativ getesteten Patienten (n=119), die durchgehend anti-HEV IgG positiv getesteten (n=20; Gruppe 1) sowie die ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv (n=7; Gruppe 2) getesteten Patienten (s. Tab. 5). Eine anti-HEV IgG-Konzentration von < 20 U/ml galt als negativ, von 20-24 U/ml als grenzwertig und von > 24 U/ml als positiv. Man erkennt, dass es in jeder Gruppe zu einem signifikanten Abfall des Titers vom Zeitpunkt vor OLT zum ersten Verlaufszeitpunkt zu Monat 6 kommt ($p < 0,05$) und der Titer anschließend konstant bleibt (s. Tab. 5).

Außerdem sind die Unterschiede zwischen den 3 verschiedenen Gruppen zu allen Zeitpunkten signifikant ($p < 0,05$). Patienten der Gruppe 1 (n=20) hatten in der positiven Probe zum Zeitpunkt vor OLT mit 68 U/ml einen signifikant höheren Antikörpertiter als Patienten der Gruppe 2 (n=7; anti-HEV IgG-Konzentration=28,8 U/ml; $p < 0,01$). Tabelle 5 ist zu entnehmen, dass die anti-HEV IgG-Konzentrationen in Gruppe 2 (n=7) zu den untersuchten Zeitpunkten nach OLT (zu denen diese Patienten im ELISA anti-HEV IgG negative Befunde aufwiesen) signifikant höher waren als die ELISA-Ergebnisse der durchgehend seronegativ getesteten Patienten ($p < 0,01$).

Tabelle 5: Anti-HEV IgG-Konzentrationen (U/ml) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zwischen den durchgehend anti-HEV IgG negativ getesteten Patienten (n=119), den durchgehend anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und den nur vor orthotoper Lebertransplantation (OLT) anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7). Eine anti-HEV IgG-Konzentration von < 20 U/ml galt als negativ, von 20-24 U/ml als grenzwertig und von > 24 U/ml als positiv. Im Falle eines grenzwertigen ELISA's wurde ein Westernblot durchgeführt, dessen Ergebnis die jeweilige Serumprobe als positiv oder negativ bewertete.

Patientengruppe	Mittels ELISA gemessene anti-HEV IgG-Konzentration [U/ml; Mittelwert \pm SD (Spannweite)]			
	vor OLT	Monat 6	Monat 12	Monat 36
Durchgehend seronegativ getestete Patienten (n=119)	4,95 \pm 4,83 (0,9-23,23)	3,45 \pm 3,09 (0,78-16,27)	3,48 \pm 3,28 (0,83-14,17)	3,52 \pm 3,48 (0,90-18,77)
Gruppe 1 (n=20)	68,52 \pm 28,12 (34,55-130,19)	56,35 \pm 34,17 (22,78-148,01)	54,26 \pm 33,86 (20,61-145,47)	52,58 \pm 33,08 (20,00-144,91)
Gruppe 2 (n=7)	28,75 \pm 5,23 (22,34-36,20)	10,08 \pm 4,02 (4,09-16,22)	10,54 \pm 4,68 (4,72-18,02)	10,91 \pm 4,54 (5,00-17,79)

Anmerkung. OLT, orthotopie Lebertransplantation; SD, standard deviation (*engl.*, Standardabweichung). Die Differenzen der anti-HEV IgG-Konzentrationen (U/ml) waren zu allen Untersuchungszeitpunkten zwischen den 3 Gruppen statistisch signifikant ($p < 0,05$). Der p-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests berechnet.

3.1.4 Die Sensitivität des HEV-ELISA's im Vergleich zum HEV-Westernblot

Aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber dem ELISA gilt der HEV-Westernblot als Bestätigungstest bei grenzwertigem anti-HEV ELISA-Befund (20-24 U/ml). Für die vorliegende Arbeit ist die Indikationsstellung des Westernblots in Patienten und Methoden unter 2.8.2 beschrieben. Insgesamt wurden von 49 im HEV-ELISA getesteten Serumproben HEV-Westernblot-Testungen durchgeführt. Es wurden 8 anti-HEV IgG grenzwertige, 27 zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positive und 14 anti-HEV IgG negative ELISA-Proben (Serumproben Monat 6 und Monat 12 nach OLT von den ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten; Gruppe 2 (n=7)) mittels HEV-Westernblot getestet.

45 von 49 Serumproben wurden im HEV-Westernblot positiv getestet (92%). 7 von 8 im ELISA anti-HEV IgG grenzwertig getestete Serumproben waren im anti-HEV Westernblot positiv (88%). Alle 27 im ELISA zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Serumproben wurden im anti-HEV Westernblot positiv getestet (100%). 11 der 14 (79%) im ELISA negativ getesteten Verlaufsproben von Patienten der Gruppe 2 (n=7) waren im anti-HEV Westernblot positiv (s. Abb. 10).

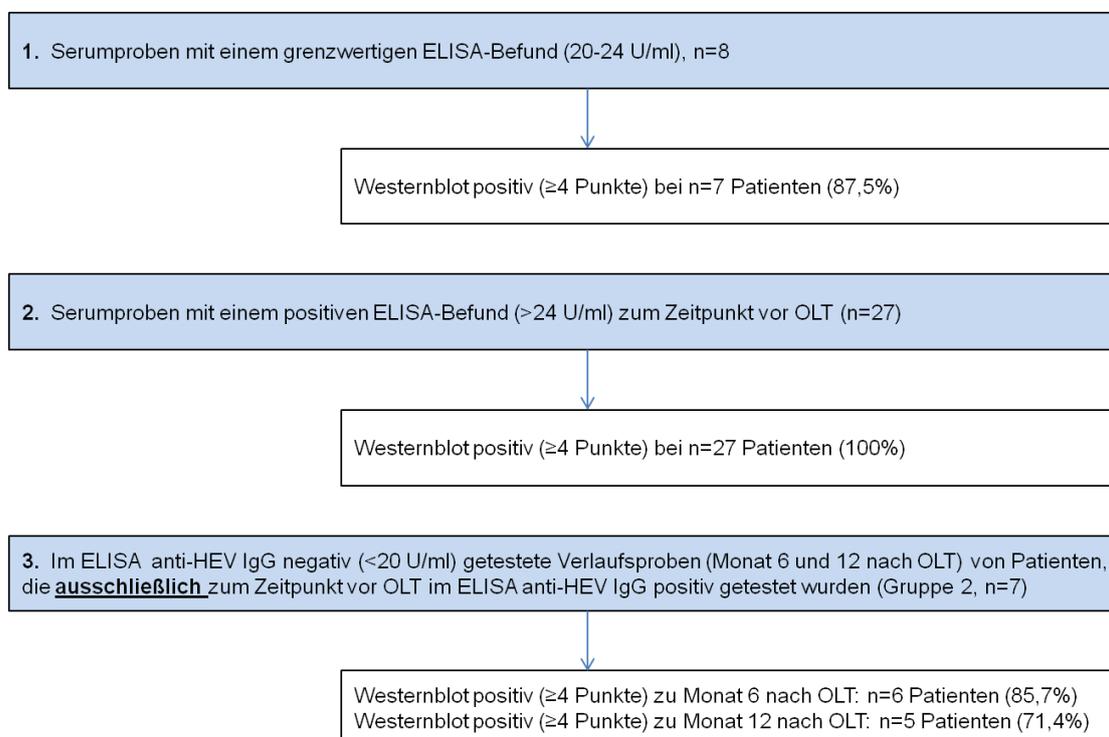


Abbildung 10: Ergebnisse des Westernblots in Abhängigkeit vom ELISA-Ergebnis. Von 49 Serumproben wurden Westernblots angefertigt; 45 davon waren positiv (≥ 4 Punkte) und 4 negativ (≤ 2 Punkte). Ein Ergebnis von 3 Punkten im HEV-Westernblot, welches in der vorliegenden Testreihe nicht vorkam, wäre als grenzwertig zu verstehen gewesen.

Es sollte außerdem untersucht werden, ob die anti-HEV IgG-Konzentration im ELISA (U/ml) mit der Punktzahl im Westernblot, die sich nach einem vom Hersteller (Fa. Mikrogen) vorgegebenen Schema aus der Farbreaktion der verschiedenen Antigenbanden berechnete, korrelierte. Hierfür wurden die Punktesummen des Westernblots gegen die im ELISA ermittelten anti-HEV IgG-Konzentrationen in einem kartesischen Koordinatensystem aufgetragen (s. Abb. 11). Es ist kein linearer Zusammenhang erkennbar.

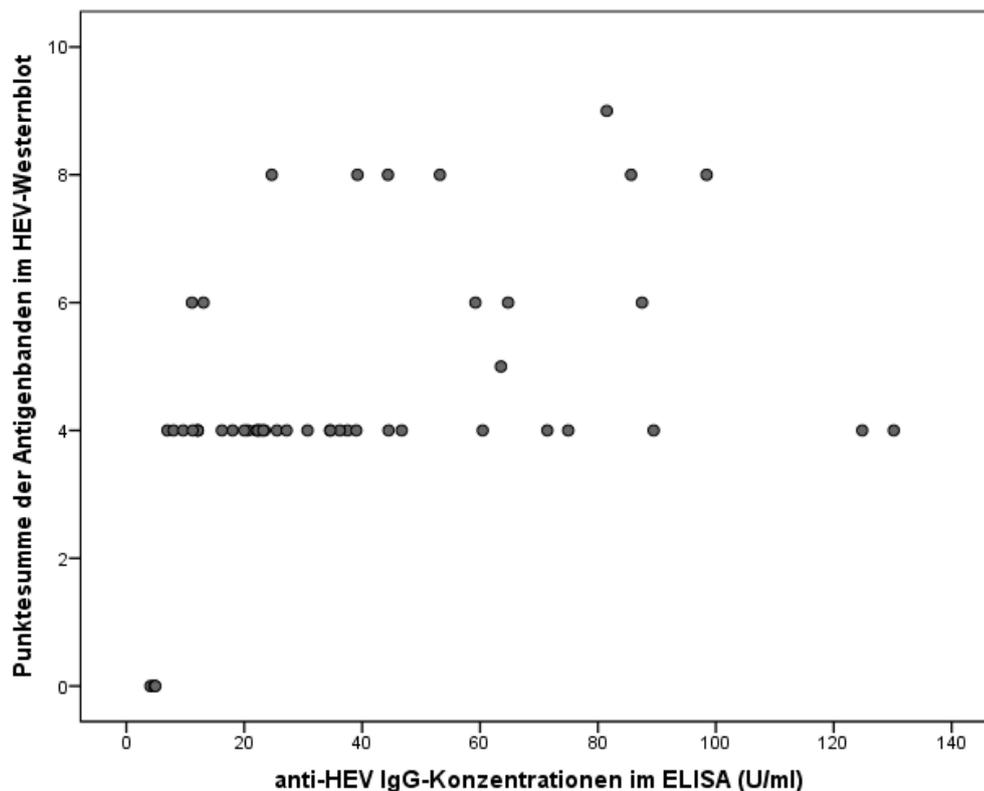


Abbildung 11: Auftragung der Punktesummen aus dem Westernblot gegen die anti-HEV IgG-Konzentrationen (U/ml) aus dem ELISA (n=49). Ein Westernblot-Ergebnis von ≥ 4 Punkten galt als positiv, von 3 Punkten als grenzwertig und von ≤ 2 Punkten als negativ. Eine anti-HEV IgG-Konzentration von < 20 U/ml galt als negativ, von 20-24 U/ml als grenzwertig und von > 24 U/ml als positiv. Es ist kein linearer Zusammenhang erkennbar.

3.1.5 Antikörperverteilungsmuster der positiven HEV-Westernblots

Betrachtet man das Antikörperverteilungsmuster aller positiven Westernblots (n=45 von 49 durchgeführten Westernblots; 92%) in Abbildung 12, so reagierte in 44 von 45 positiven Blots der C-terminale Teil des ORF2-Antigens (O2C) positiv und einmal grenzwertig. Der N-terminale Teil des ORF2-Antigens (O2N) reagierte bei 2 positiven

HEV-Westernblots grenzwertig; Die O3-Bande (Antigenbande des ORF3-Proteins) reagierte in 8 von 45 positiven Blots positiv und 4 mal grenzwertig.

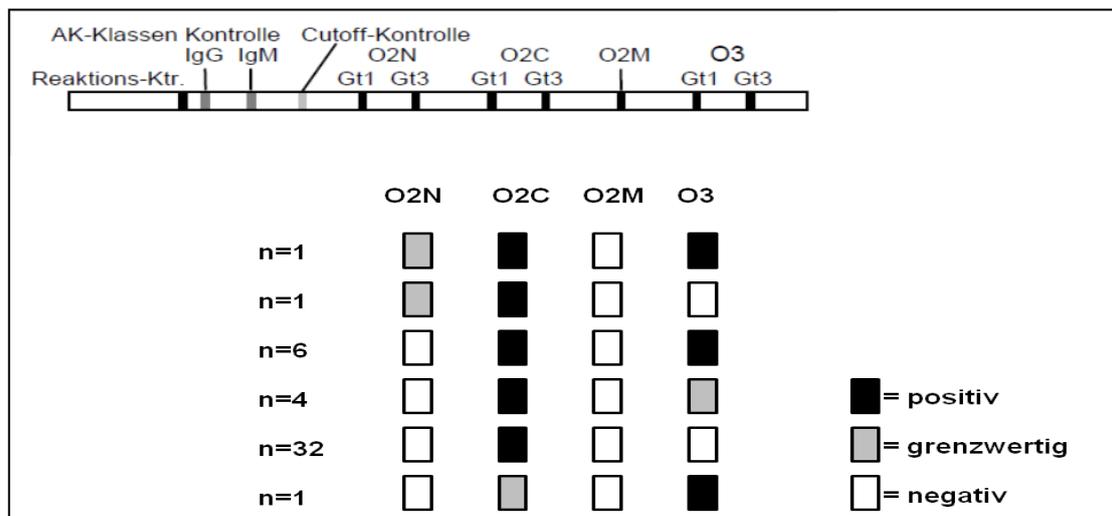


Abbildung 12: Antikörperverteilungsmuster der 45 positiv getesteten Westernblots. Im oberen Abschnitt der Abbildung ist ein HEV-Westernblot-Teststreifen dargestellt. Auf diesem sind die verschiedenen Antigene des HEV aufgetragen: der N- und C-terminale Teil sowie das Mittelstück des ORF2-Proteins (O2N, O2C, O2M) und das ORF3-Protein (O3). Der Westernblot unterscheidet außerdem zwischen Genotyp 1- und Genotyp 3-Antikörpern (Gt1, Gt3). Zusätzlich zu den Antikörper (AK) – Klassen Kontrollen (IgG, IgM) gibt es eine Reaktionskontrolle (Reaktions-Ktr.), die sicherstellt, dass Serum zur Untersuchung aufgetragen wurde. Die Evaluierung jeder Bande bezieht sich auf die Cutoff-Kontrolle. Bei Antigenen, für die es zwei Genotyp-Banden gibt, wird diejenige gewählt, die stärker erscheint.

3.1.6 Quantitative Auswertung der HEV-Westernblot-Ergebnisse für die zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten

Die im ELISA ermittelten anti-HEV IgG-Konzentrationen waren zum Zeitpunkt vor OLT für die durchgehend seropositiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und die ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7) signifikant unterschiedlich. Es interessierte daher die Frage, ob ein vergleichbarer Zusammenhang für die im HEV-Westernblot aus den verschiedenen Antigenbanden berechneten Punktzahlen vorlag. In Tabelle 6 sind die absoluten Ergebnisse (Punktzahlen) der Westernblot-Testungen dargestellt. Zum Zeitpunkt vor OLT erreichten Patienten der Gruppe 1 (n=20) eine höhere Punktzahl im Blot als Patienten der Gruppe 2 (n=7) (5,6 vs. 4,6 Punkte). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,14$).

Tabelle 6: Vergleich der Gesamtpunktzahlen der im Westernblot untersuchten Serumproben zum Zeitpunkt vor orthotoper Lebertransplantation (OLT). Es wurden die Farbintensitäten der jeweiligen Banden mit der Cutoff-Kontrolle verglichen, Punkte nach einem vom Hersteller vorgegebenen Schema für jede Antigenbande ermittelt und anschließend zu einem Gesamtwert addiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von allen Patienten, die zum Zeitpunkt vor OLT ein positives anti-HEV IgG-Ergebnis im ELISA aufwiesen (n=28), der zu allen Zeitpunkten anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und der ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG seropositiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7). Ein Westernblot-Ergebnis von ≥ 4 Punkten galt als positiv und von ≤ 2 Punkten als negativ. Ein Ergebnis von 3 Punkten, welches in der vorliegenden Testreihe nicht vorkam, wäre als grenzwertig zu verstehen gewesen.

Patientengruppe	Punktesumme der Antigenbanden des Westernblots [Punkte; Mittelwert \pm SD (Spannweite)]
Alle vor OLT seropositiv getesteten Patienten (n=28)	5,29 \pm 1,80 (4-9)
Gruppe 1 (n=20)	5,60 \pm 1,88 (4-9)
Gruppe 2 (n=7)	4,57 \pm 1,51 (4-8)

Anmerkung. OLT, orthotope Lebertransplantation; SD, standard deviation (*engl.*, Standardabweichung); der Unterschied im Mittelwert zwischen Gruppe 1 (n=20) und Gruppe 2 (n=7) war statistisch nicht signifikant ($p=0,14$). Der p-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests berechnet.

3.1.7 Ergebnisse der Aviditätstestungen der zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten

Die Avidität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen. Eine Aviditätstestung kann helfen, den Zeitpunkt der Infektion einzuschätzen. Für die Testdurchführung wurden je zwei HEV-Westernblot-Teststreifen mit derselben Serumprobe inkubiert, wobei einem der beiden Teststreifen Aviditätslösung hinzugefügt wurde. Diese lässt niedrig avide Antikörper, die eher im Rahmen einer (post)akuten Infektion gebildet werden, abdiffundieren, während hoch avide Antikörper gebunden bleiben. Man dividierte die beiden Punktzahlen und erhielt den Aviditätsindex für eine Serumprobe. Ein Aviditätsindex von $< 0,5$ könnte dabei auf einen frühen Infektionszeitpunkt hinweisen.

Es sollte für die zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (n=28) eine Abschätzung des Infektionszeitpunktes erfolgen. Außerdem interessierte die Frage, ob es hinsichtlich des Infektionszeitpunktes Unterschiede zwischen Patienten der Gruppe 2 (n=7) und Gruppe 1 (n=20) gab und möglicherweise der Infektionszeitpunkt Einfluss auf den HEV IgG-Antikörperverlauf nach OLT nahm.

Die Zeitpunkte, in welchen die Serumproben vor OLT asserviert wurden, wiesen eine große Spannweite auf (0-19 Monate, durchschnittlich 2,7 Monate für die n=28 zum

Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten). Daher erfolgte zunächst in Abhängigkeit vom Zeitpunkt, wann die Serumprobe vor OLT abgenommen wurde, ein Vergleich zwischen Gruppe 1 (n=20) und 2 (n=7). Der gemittelte Abstand vom Untersuchungszeitpunkt vor OLT zur Lebertransplantation war in Gruppe 2 mit 4,4 Monaten größer als in Gruppe 1 (2,2 Monate; $p=0,54$).

Von allen 28 Patienten, die vor OLT ein positives anti-HEV IgG-Ergebnis aufwiesen, hatten 24 Patienten (86%) einen Aviditätsindex $> 0,5$ und 4 Patienten (14%) einen Aviditätsindex von $0,5$. Es gab somit keine Hinweise auf kürzlich stattgehabte Infektionen. Die errechneten Mittelwerte unterschieden sich zwischen Patienten der Gruppe 1 (n=20) und 2 nicht signifikant voneinander ($0,88$ vs. $0,86$; $p=0,97$). Das detaillierte Ergebnis der Aviditätstestung ist in tabellarischer Form dem Anhang der Arbeit beigelegt.

3.1.8 Medikamentöse Immunsuppression der zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten

Um herauszufinden, welche Bedeutung die medikamentöse Immunsuppression für den Antikörperverlauf nach OLT besitzt, wurde das immunsuppressive Medikamentenschema zum Zeitpunkt Monat 6 nach OLT, zu dem 7 von anfangs 28 im ELISA anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten negativ wurden (Gruppe 2), notiert. Ein Vergleich wurde zwischen den durchgehend anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und den ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT seropositiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7) durchgeführt, um die Rolle der immunsuppressiven Therapie in diesem Kontext zu evaluieren.

Das am häufigsten verwendete immunsuppressive Pharmakon war Tacrolimus. Zu Monat 6 nach OLT war es Bestandteil der immunsuppressiven Therapie bei 18 Patienten aus Gruppe 1 (90%) sowie 6 Patienten aus Gruppe 2 (86%). Die durchschnittlichen Tacrolimus-Blutspiegel zu Monat 6 nach OLT zeigten zwischen Patienten der Gruppe 1 ($7,82$ ng/ml) und 2 ($7,77$ ng/ml) keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$). Eine ausführliche Darstellung der immunsuppressiven Medikamentenschemata ist in tabellarischer Form dem Anhang der Arbeit hinterlegt.

Abbildung 13 setzt zum Untersuchungszeitpunkt Monat 6 nach OLT den Tacrolimus-Spiegel (ng/ml) in Abhängigkeit zu den im ELISA ermittelten anti-HEV IgG-

Konzentrationen (U/ml) und vergleicht diesen Quotienten zwischen Gruppe 1 (n=20) und Gruppe 2 (n=7). Der Unterschied der Mittelwerte für diesen Quotienten war statistisch signifikant (0,17 ng/ml / U/ml in Gruppe 1 vs. 0,97 ng/ml / U/ml in Gruppe 2; $p < 0,01$).

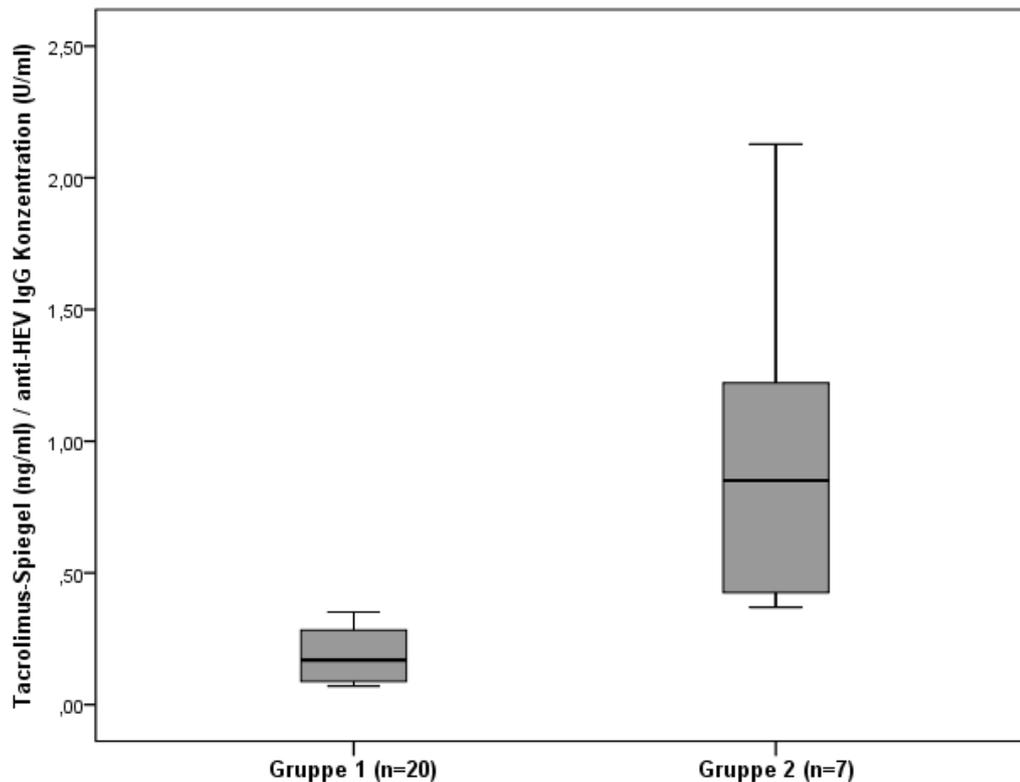


Abbildung 13: Der Tacrolimus-Spiegel (ng/ml) in Abhängigkeit von der im HEV-ELISA bestimmten anti-HEV IgG-Konzentration (U/ml). Der Vergleich erfolgte zwischen den durchgehend seropositiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und den ausschließlich vor orthotoper Lebertransplantation (OLT) anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7) zum Untersuchungszeitpunkt Monat 6 nach OLT. Bei 18 Patienten aus Gruppe 1 (90%) sowie 6 Patienten aus Gruppe 2 (86%) war Tacrolimus Bestandteil der immunsuppressiven Therapie zu Monat 6 nach OLT. Der Unterschied der Mittelwerte für den Quotienten aus Tacrolimus-Spiegel und anti-HEV IgG-Konzentration war statistisch signifikant (0,17 ng/ml / U/ml in Gruppe 1 vs. 0,97 ng/ml / U/ml in Gruppe 2; $p < 0,01$).

3.1.9 Fallbeschreibung der Patienten, die erst zu einem Zeitpunkt nach OLT anti-HEV IgG positiv getestet worden sind

Insgesamt 31 Patienten zeigten im ELISA-Screening zu mindestens einem Untersuchungszeitpunkt einen positiven anti-HEV IgG-Befund. 28 Patienten (19%) waren bereits vor OLT anti-HEV IgG positiv, d.h. der Kontakt mit HEV erfolgte vor der Lebertransplantation. 3 Patienten wurden zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG negativ getestet und zu mindestens einem Verlaufszeitpunkt nach OLT positiv. Hiervon wurde

ein Patient ab Monat 6 seropositiv getestet (im Folgenden als Patient 1 bezeichnet) und 2 Patienten ausschließlich zum Zeitpunkt Monat 12 nach OLT (als Patienten 2 und 3 bezeichnet).

3.1.9.1 Patient 1 – eine akute, selbstlimitierende HEV-Infektion

Es handelt sich um einen 37-jährigen männlichen Patienten, der aufgrund einer alkoholtoxischen Leberzirrhose 2005 lebertransplantiert wurde. Der Patient war vor OLT seronegativ für anti-HEV IgM und IgG sowie für HEV-RNA. In der Serumprobe 6 Monate nach OLT (Tag 182) zeigte der Patient positive Befunde für diese 3 Infektionsparameter. Zu den Verlaufszeitpunkten Monat 12 (Tag 364) und Monat 36 (Tag 1105) nach OLT blieb einzig anti-HEV IgG nachweisbar. Außer zu diesen 4 Untersuchungszeitpunkten gab es keine weiteren verfügbaren Patientenserum.

Abbildung 14 zeigt den Transaminasen- (nur Alanin-Aminotransferase, ALT) und den Bilirubin-Verlauf über den gesamten Zeitraum nach OLT. Während die Bilirubin-Spiegel über den gesamten Untersuchungszeitraum unterhalb des oberen Normwertes blieben, stiegen die Transaminasen-Werte, nachdem sie 15 Tage nach OLT unterhalb des oberen Normwertes gefallen waren (der initiale Anstieg der Transaminasen postoperativ ist im Sinne des Reperfusionsschadens zu interpretieren), zu Monat 4 (Tag 95) wieder an. Die höchste ALT-Erhöhung (2,7-fach des oberen Normwertes) wurde zu Monat 7 (Tag 222) erreicht. In der Folge zeigte sich ein Rückgang der ALT und ab Monat 10 nach OLT (Tag 306) eine anhaltende Normalisierung der Transaminasen.

Die initiale Immunsuppression des Patienten bestand aus Tacrolimus (Blutspiegelkontrolle) und Prednison (Reduktionsschema). Prednison wurde zu Monat 10 (Tag 310) abgesetzt, sodass anschließend die Immunsuppression des Patienten ausschließlich aus Tacrolimus bestand (s. Abb. 14).

Leberbiopsien wurden zu Monat 12 und 36 nach OLT durchgeführt. Die Leberbiopsie zu Monat 12 zeigte eine milde portale Fibrose ohne Septen sowie spärliche lymphozytäre Infiltrate und die zu Monat 36 durchgeführte Leberbiopsie eine milde portale Fibrose.

Über den gesamten Verlauf wurden keine auffälligen klinischen Symptome dokumentiert. Im Rahmen der Patientenbefragung gab der Patient einen Konsum von Innereien (seltener als 1 Mal pro Monat) sowie den Konsum von Wild (seltener als 10 Mal im Jahr) an. Der Konsum von Wildschweinfleisch sowie eine Reise in eine HEV-endemische Region wurden verneint und es waren keine Bluttransfusionen im

Beobachtungszeitraum für den Patienten dokumentiert. Außerdem ergab eine phylogenetische Analyse der Sequenz der HEV-RNA positiven Serumprobe zu Monat 6 nach OLT, dass der Patient mit HEV des Genotyp 3 infiziert war – ein Genotyp, der in westlichen Industrieländern auch bei Tieren gefunden werden kann. Die beschriebenen Befunde korrelieren somit mit einer autochton erworbenen, akut selbstlimitierenden HEV-Infektion.

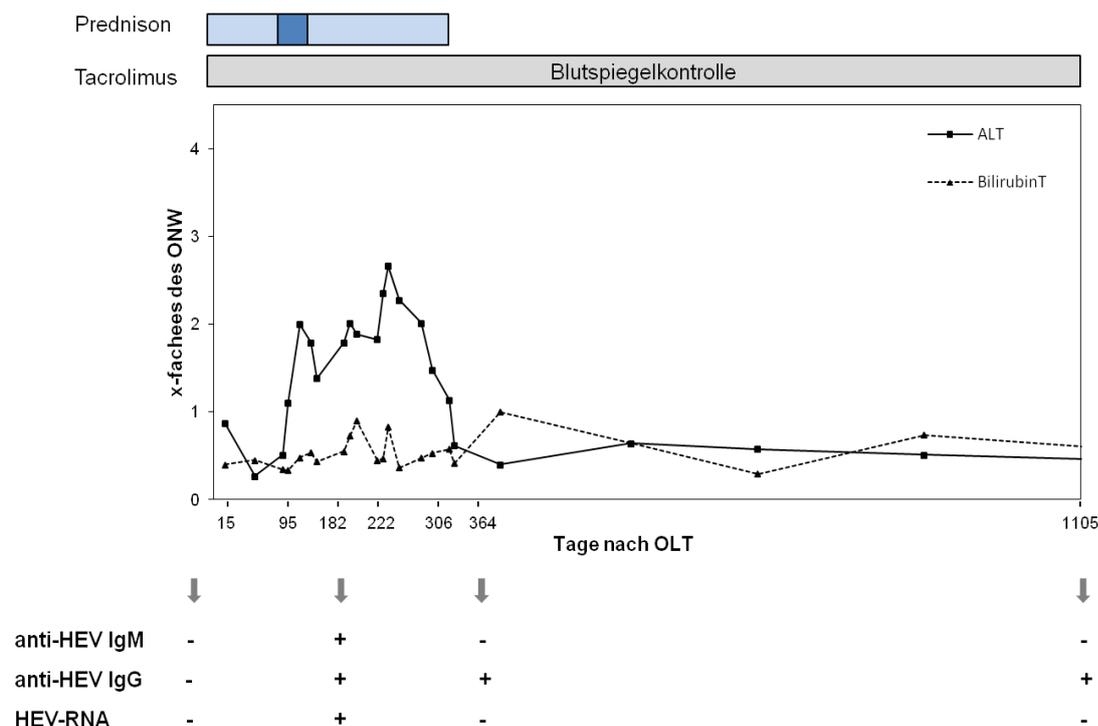


Abbildung 14: Laborchemischer und serologischer Verlauf einer akuten, selbstlimitierenden HEV-Infektion bei Patient 1, der aufgrund einer alkoholtoxischen Leberzirrhose lebertransplantiert wurde. ALT- und Gesamtbilirubin-Werte sind als x-faches des oberen Normwertes (ONW) dargestellt. Anti-HEV IgM-, anti-HEV IgG- und HEV-RNA-Ergebnisse sind zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten angegeben. Das immunsuppressive Regime ist in Form von Balken aufgezeigt. Tacrolimus war über den gesamten Verlauf Bestandteil der immunsuppressiven Therapie (Blutspiegelkontrolle: ng/ml). Initial wurde zusätzlich Prednison appliziert (Reduktionsschema hellblauer Balken). Mit dem ALT-Anstieg wurde die Dosis zu Tag 104 nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) bei Verdacht auf eine milde, akute Abstoßungsreaktion von 2,5 mg/Tag auf 15 mg/Tag erhöht (dunkelblauer Balken) und ab Tag 131 wieder langsam reduziert (hellblauer Balken), bis Prednison zu Tag 310 abgesetzt werden konnte. Insgesamt waren die Transaminasen über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten erhöht (211 Tage).

3.1.9.2 Patienten 2 und 3 – zwei Patienten mit einem positiven anti-HEV IgG-Befund zum Zeitpunkt Monat 12 nach OLT

Nachfolgend werden die klinischen und laborchemischen Verläufe der ausschließlich zu Monat 12 nach OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (als Patient 2 und 3 bezeichnet) dargestellt.

Aufgrund einer HBV-bedingten Leberzirrhose erhielt der 47-jährige, männliche Patient 2 im März 2003 ein Lebertransplantat. Bei persistierend hohen Transaminasen führte man 41 Tage nach OLT eine Leberbiopsie durch und konnte eine akute Rejektion sowie eine HBV-Reinfektion molekulargenetisch ausschließen. Im 4. Monat nach OLT (Tag 111) war der ALT-Wert 17,8-fach erhöht. Eine weitere Biopsie zeigte das Bild einer chronischen Rejektion Grad II, woraufhin das immunsuppressive Regime auf eine Triple-Therapie bestehend aus Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil (MMF) und Prednisolon erweitert wurde (zur genauen immunsuppressiven Therapie im Zeitverlauf s. Abb. 15). Die Transaminasen zeigten seit dem Zeitpunkt Monat 7 nach OLT (Tag 182) eine sich normalisierende Tendenz, blieben jedoch im gesamten weiteren Verlauf leichtgradig erhöht. Zudem konnte in der anti-HEV IgG positiven Serumprobe zum Zeitpunkt Monat 12 nach OLT eine rezidivierende HBV-Infektion mit einer HBV-Viruslast von 9064 Kopien/ml nachgewiesen werden.

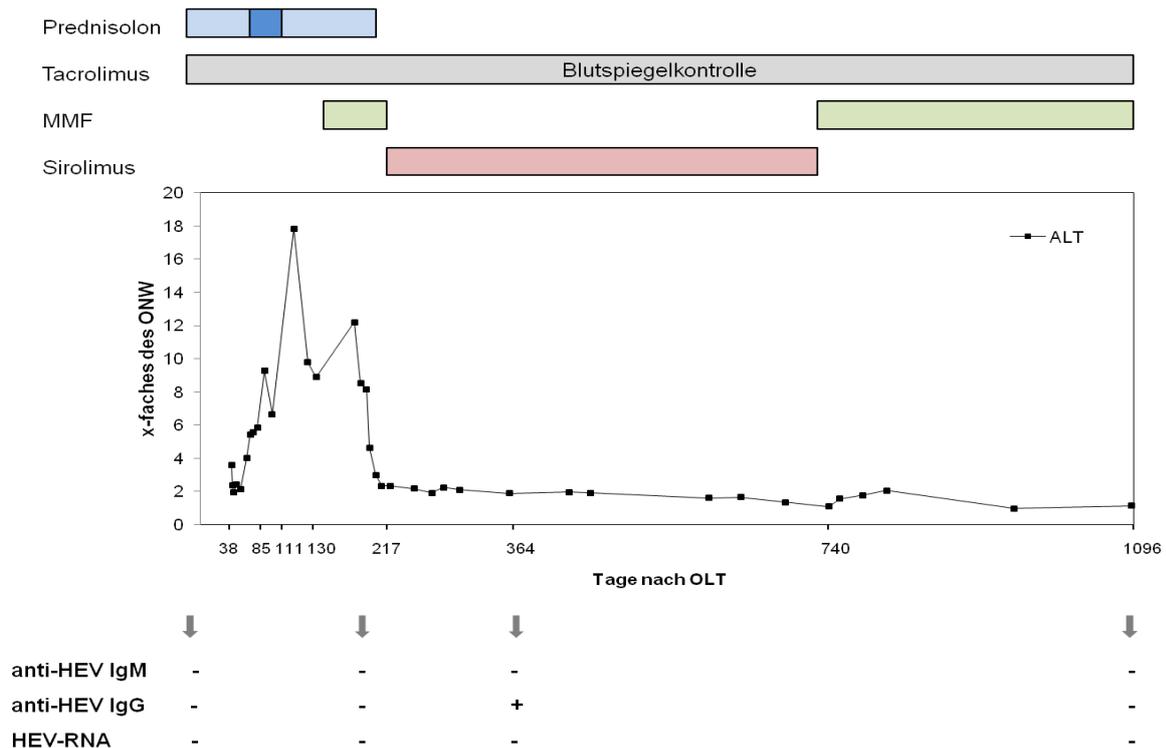


Abbildung 15: ALT-Verlauf von Patient 2, der aufgrund einer HBV-bedingten Leberzirrhose lebertransplantiert wurde. Patient 2 wies ausschließlich in der Serumprobe zu Monat 12 nach OLT einen positiven anti-HEV IgG-Befund auf. Es gelang kein RNA-Nachweis. ALT-Werte sind als x-faches des oberen Normwertes (ONW) dargestellt. Patient 2 zeigte zwischen Monat 2 (Tag 38) und 7 (Tag 217) nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) einen signifikanten Anstieg der Transaminasen. Auch im weiteren Verlauf blieben die ALT-Werte leichtgradig erhöht. Die initiale Immunsuppression des Patienten bestand aus Tacrolimus (Blutspiegelkontrolle) und Prednisolon (Reduktionsschema). Die Anfangsdosis für Prednisolon betrug 20 mg/Tag (hellblauer Balken). Zu Tag 85 nach OLT betrug die Prednisolon-Dosis 15 mg/Tag (dunkelblauer Balken) und wurde zu Tag 111 wieder auf 20 mg/Tag erhöht. Anschließend konnte die Dosierung kontinuierlich reduziert werden; zu Tag 217 nach OLT wurde Prednisolon abgesetzt. Mycophenolat-Mofetil (MMF) wurde zu Tag 130 nach OLT zum immunsuppressiven Schema hinzugefügt (1 g/Tag), aber aufgrund gastrointestinaler Nebenwirkungen ab Tag 205 durch Sirolimus (2 g/Tag) ersetzt. Zu Monat 24 wurde Sirolimus durch eine Kombination aus Tacrolimus plus MMF (1 g/Tag) ersetzt.

Patient 3, eine 64-jährige, weibliche Patientin, erhielt im Mai 2004 eine Lebertransplantation bei ischämischer Cholangiopathie. Vorausgegangen war eine iatrogene Sigmoidperforation im Rahmen einer Koloskopie 2003. Nach einer Operation kam es zu zahlreichen Komplikationen (wie Nachblutungen und einer Enterokokkensepsis), die zu einem Multiorganversagen mit ARDS führten. Im Rahmen der schweren Erkrankung verschlechterte sich die Leberfunktion zunehmend und die Patientin wurde transplantationspflichtig.

Zum Zeitpunkt Monat 6 nach OLT (Tag 186) wurde die Tacrolimus-Dosis im Rahmen der halbjährlichen Routineuntersuchung reduziert. In der Folge stieg der ALT-Wert an und war an Tag 219 nach OLT 3,4-fach erhöht. Die immunsuppressive Dosis wurde wieder erhöht und es kam zu einem Abfall des ALT-Wertes, der im weiteren Verlauf

aber stets erhöht blieb. Ergänzt wurde die immunsuppressive Therapie durch Prednisolon (Reduktionsschema, s. Abb. 16).

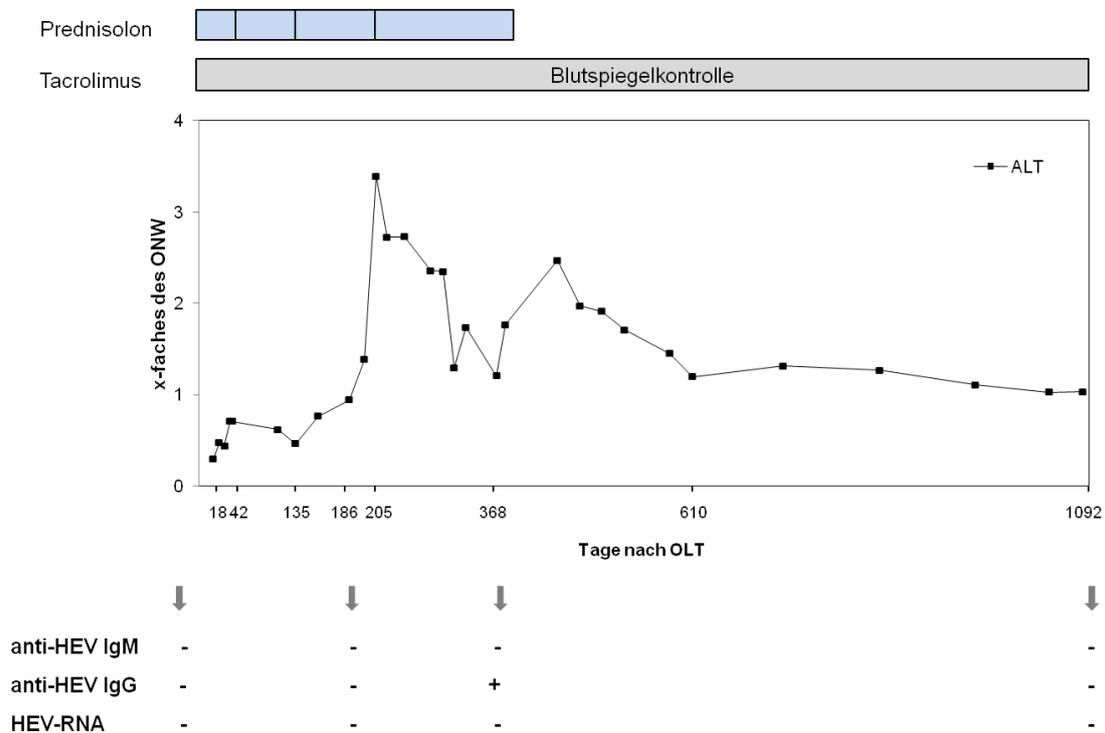


Abbildung 16: ALT-Verlauf für Patient 3, der aufgrund einer ischämischen Cholangiopathie lebertransplantiert wurde, Patient 3 wurde ausschließlich zu Monat 12 nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) anti-HEV IgG positiv getestet. ALT-Werte sind als x-faches des oberen Normwertes (ONW) angegeben. Bei Patient 3 zeigt der ALT-Verlauf zu Monat 6 nach OLT (Tag 186) einen Anstieg sowie einen im Folgenden undulierenden Verlauf der Transaminasen. Die initiale Immunsuppression bestand aus Tacrolimus (Blutspiegelkontrolle) und Prednisolon (Reduktionsschema). Die Prednisolon-Dosis wurde kontinuierlich reduziert. Von 10 mg/Tag zu Tag 42 nach OLT, auf 5 mg/Tag zu Tag 135 nach OLT und 2,5 mg/Tag zu Tag 205 nach OLT, bevor Prednisolon zu Tag 368 abgesetzt werden konnte.

Für beide Patienten war das Ergebnis des HEV-Westernblots der zum Zeitpunkt Monat 12 nach OLT im ELISA anti-HEV IgG positiv getesteten Serumprobe ebenfalls positiv. Während bei Patient 2 das im ELISA ermittelte anti-HEV IgG-Ergebnis zu Monat 36 nach OLT mit 1,3 U/ml eindeutig negativ war, lag dieses bei Patient 3 mit 19,5 U/ml nahe am Grenzwert-Bereich (20-24 U/ml). Das HEV-Westernblot-Ergebnis der Serumprobe zum Zeitpunkt Monat 36 nach OLT war für Patient 3 positiv. Von Patient 2 reichte das Volumen der Serumprobe zum Zeitpunkt Monat 36 nach OLT für eine Westernblot-Untersuchung nicht mehr aus. Es standen für beide Patienten zwischen den angegebenen Untersuchungszeitpunkten keine weiteren Serumproben zur Verfügung.

3.2 Patientencharakteristika und Risikofaktoren bei anti-HEV Seropositivität

3.2.1 Demographische Faktoren

Um die Relevanz demographischer Faktoren für den Erwerb einer HEV-Infektion zu evaluieren, wurden in der ELISA-Kohorte (n=150) verschiedene demographische Variablen erfasst und zwischen den anti-HEV IgG positiv sowie negativ getesteten Patienten verglichen. Wie Tabelle 7 zu entnehmen ist, wurden 75% (n=112) der Patienten aus der ELISA-Kohorte (n=150) in Deutschland geboren, 7% (n=10) stammten aus der Türkei und 18% (n=27) aus einem anderen Land. Zum Zeitpunkt der Transplantation lebten 72% der Patienten (n=107) in der Region Berlin-Brandenburg; 60% der Patienten (n=90) in einem Ort mit mehr als 100.000 Einwohnern, 13% (n=19) in einem Ort mit einer Einwohnerzahl zwischen 20.000 und 100.000 sowie 27% (n=40) in einem Ort mit weniger als 20.000 Einwohnern.

Patienten, die zum Zeitpunkt der OLT in einem Wohnort mit weniger als 20.000 Einwohnern lebten, hatten gegenüber Patienten in einem Wohnort mit mehr als 100.000 Einwohnern eine signifikant niedrigere anti-HEV IgG-Seroprävalenz (10 vs. 28%, $p=0,03$). Bezüglich weiterer demographischer Faktoren gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen HEV-seropositiv und –seronegativ getesteten Patienten (s. Tab. 7). Patienten, die zum Zeitpunkt der OLT in Berlin lebten (n=77), wiesen eine höhere anti-HEV IgG-Seroprävalenz auf als Patienten aus anderen Bundesländern (27 vs. 12%, $p=0,06$). Außerdem hatten Patienten, die aus der Türkei stammten (n=10), einer HEV-endemischen Region, eine tendenziell höhere Seroprävalenz als in Deutschland geborene Patienten (40% vs. 20%, $p=0,22$).

Tabelle 7: Anti-HEV Seroprävalenz und Odds Ratios (OR) für ausgewählte demographische Variablen sowie die Ätiologie der Lebererkrankung in der ELISA-Kohorte (n=150).

Variable	Patientenanzahl ^a , n (%) ^b (n = 150)	Anti-HEV IgG positiv, ^c % (95% KI)	OR (95% KI)	p-Wert
Geschlecht				
Männlich (Referenz)	95 (63,3)	22,1 (13,6-30,6)	1,0	
Weiblich	55 (36,7)	18,2 (7,7-28,7)	0,78 (0,34-1,81)	0,68
Geburtsland				
Deutschland (Referenz)	112 (75,2)	19,6 (12,2-27,1)	1,0	
Türkei	10 (6,7)	40,0 (3,1-76,9)	2,73 (0,71-10,50)	0,22
Sonstige ^d	27 (18,1)	18,5 (2,9-34,2)	0,93 (0,32-2,73)	1,00
Wohnort, Ew.^e				
>100.000 (Referenz)	90 (60,4)	27,8 (18,3-27,2)	1,0	
20.000 – 100.000	19 (12,8)	10,5 (4,7-25,7)	0,31 (0,07-1,42)	0,15
<20.000	40 (26,8)	10,0 (0,28-19,7)	0,29 (0,09-0,90)	0,03
Wohnregion, Bundesland^e				
Berlin (Referenz)	77 (51,7)	27,3 (17,1-37,5)	1,0	
Brandenburg	30 (20,1)	16,7 (2,5-30,8)	0,53 (0,18-1,58)	0,32
Sonstige ^f	42 (28,2)	11,9 (1,7-22,1)	0,36 (0,13-1,04)	0,06
Grunderkrankung				
Alkoholtoxische Leberzirrhose	48 (32,0)	22,9 (10,6-35,3)	1,0	
Hepatitis B	29 (19,3)	27,6 (10,3-44,9)	1,28 (0,45-3,69)	0,79
Hepatitis C	28 (18,7)	14,3 (0,47-28,1)	0,56 (0,16-1,97)	0,55
Sonstige ^g	45 (30,0)	17,8 (6,2-29,4)	0,73 (0,26-2,01)	0,61

Anmerkung. Ew., Einwohner; KI, Konfidenzintervall; OR, Odds Ratio (*engl.*, Quotenverhältnis); Referenz, Referenzgruppe.

^a Patientenzahlen variieren aufgrund unvollständiger Teilnahme an der Befragung sowie Tod im Beobachtungszeitraum.

^b Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Anzahl der Patienten, von denen die jeweilige Information erhoben werden konnte bzw. die die zugehörige Frage beantwortet haben.

^c Die anti-HEV IgG-Seroprävalenz von allen 150 getesteten Patienten lag bei 20,7%.

^d Die unter „Sonstige“ fallenden Geburtsländer waren: Polen (n=6; davon 1 Patient anti-HEV IgG positiv), Italien (n=4), Frankreich (n=2; davon 1 Patient anti-HEV IgG positiv), Großbritannien (n=2; davon 1 Patient anti-HEV IgG positiv), Kroatien und Russland (jeweils n=2), Griechenland (n=1; dieser Patient wurde anti-HEV IgG positiv getestet), Pakistan (n=1; dieser Patient wurde anti-HEV IgG positiv getestet), Indien, Südkorea, Marokko, Tschechien, Ukraine, Ungarn, Weißrussland (jeweils n=1).

^e Wohnort und Wohnregion beziehen sich zeitlich auf den Transplantationszeitpunkt.

^f Die unter „Sonstige“ fallenden Bundesländer waren: Sachsen (n=12; davon 2 Patienten anti-HEV IgG positiv), Hessen (n=7; davon 2 Patienten anti-HEV IgG positiv) Bayern (n=6), Mecklenburg-Vorpommern (n=4; davon 1 Patient anti-HEV IgG positiv), Niedersachsen (n=4), Baden-Württemberg (n=3), Nordrhein-Westfalen und Schleswig-Holstein (jeweils n=2), Bremen und Saarland (jeweils n=1).

^g Die unter „Sonstige“ fallenden Grunderkrankungen sind unter 3.1.2 in Tabelle 4 beschrieben.

3.2.2 Prävalenz von Risikofaktoren für eine HEV-Infektion

Mit Hilfe eines selbstkonzipierten Fragebogens sollten weitere Risikofaktoren für den Erwerb einer HEV-Infektion erfasst werden. Die Ergebnisse des Fragebogens sind in Tabelle 8 (s.u.) zusammengefasst dargestellt. Eine ausführlichere Darstellung ist dem Anhang der Arbeit beigelegt.

Tabelle 8: Prävalenz und Odds Ratios (OR) von anti-HEV IgG-Antikörpern in Bezug auf ausgewählte Risikofaktoren bei 123 von 150 Patienten der ELISA-Kohorte.

Variable	Patienten- anzahl ^a , n (%) ^b	Anti-HEV IgG positiv, ^c % (95% KI)	OR (95% KI)	p- Wert
Tierkontakt				
Haustiere				
Nein	61 (49,6)	19,7 (9,4-29,9)	1,0	
Ja	62 (50,4)	21,0 (10,6-31,4)	1,08 (0,45-2,61)	1,00
Beruflicher Tierkontakt				
Nein	110 (89,4)	18,2 (10,9-25,6)	1,0	
Ja	13 (10,6)	38,5 (7,9-69,1)	2,81 (0,83-9,52)	0,14
Essgewohnheiten				
Konsum von Fleischprodukten, Anzahl / Monat				
0-10	17 (14,2)	17,7 (2,6-37,9)	1,0	
11-20	26 (21,7)	19,2 (3,0-35,5)	1,11 (0,23-5,41)	1,00
>20	77 (64,2)	22,1 (12,6-31,6)	1,32 (0,34-5,14)	1,00
Schweinefleisch und Schinken, Anzahl / Monat				
0-5	41 (33,9)	19,5 (6,9-32,2)	1,0	
6-10	27 (22,3)	7,4 (3,2-18,0)	0,33 (0,06-1,69)	0,29
>10	53 (43,8)	28,3 (15,8-40,8)	1,63 (0,61-4,32)	0,35
Konsum von Innereien				
Nein	33 (27,5)	18,1 (4,3-32,1)	1,0	
Ja	87 (72,5)	21,8 (13,0-30,7)	1,26 (0,45-3,48)	0,80
Konsum von Innereien, Anzahl / Monat				
0	33 (27,5)	18,2 (4,3-32,1)	1,0	
<1	43 (35,8)	16,3 (4,8-27,8)	0,86 (0,26-2,90)	1,00
1	30 (25,0)	16,7 (2,5-30,8)	0,90 (0,24-3,32)	1,00
>1	14 (11,7)	50,0 (20,0-80,0)	4,50 (1,14-17,73)	0,04
Konsum von Wild				
Nein	78 (63,9)	19,2 (10,3-28,2)	1,0	
Ja	44 (36,1)	22,7 (9,8-35,6)	1,23 (3,05-0,50)	0,65
Konsum von Wild, Anzahl / Jahr				
0	78 (63,9)	19,2 (10,3-28,2)	1,0	
1-10	38 (31,1)	21,1 (7,5-34,6)	1,12 (0,43-2,93)	0,81
>10	6 (4,9)	33,3 (20,9-87,5)	2,10 (0,35-12,56)	0,60
„Sonstige Risikofaktoren“				
Anzahl der Sexualpartner bis zur OLT				
1-10	83 (70,3)	14,5 (6,7-22,2)	1,0	
>10	35 (29,7)	31,4 (15,3-47,6)	2,71 (1,06-6,94)	0,04
Stattgehabter i.v.-Drogenkonsum				
Nein	119 (97,5)	20,2 (12,6-27,5)	1,0	
Ja	3 (2,5)	33,3	1,98 (0,17-2,27)	0,50
Stattgehabte Bluttransfusionen				
Nein	77 (63,1)	22,1 (12,6-31,6)	1,0	
Ja	45 (36,9)	17,8 (6,2-29,4)	0,76 (1,94-0,30)	0,65
Urlaubsreise in ein HEV-Endemiegebiet				
Nein	74 (60,7)	18,9 (9,8-28,1)	1,0	
Ja	48 (39,3)	22,9 (10,6-35,3)	1,27 (0,52-3,11)	0,65
Beruflicher Kontakt zu Abwässern				
Nein	106 (86,9)	18,9 (11,3-26,4)	1,0	
Ja	16 (13,1)	31,3 (5,7-56,8)	1,95 (0,61-6,25)	0,32

Anmerkung. i.v., intravenös; KI, Konfidenzintervall; OLT, orthotope Lebertransplantation.

^a Patientenzahlen variieren aufgrund unvollständiger Teilnahme an der Befragung sowie Tod im Follow-up-Zeitraum.

^b Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Anzahl der Patienten, die die zugehörige Frage beantwortet haben. Insgesamt 123 Patienten aus der ELISA-Kohorte (82%) beantworteten den Fragebogen. 116 von 123 Patienten (94%) beantworteten den Fragebogen vollständig.

^c Die anti-HEV IgG-Seroprävalenz von allen 150 getesteten Patienten lag bei 20,7% (n=31).

3.2.2.1 Tierkontakt

Der HEV-Infektion liegt in Industrieländern eine zoonotische Transmission zu Grunde, sodass der Kontakt zu Tieren als mögliche Ursache für eine HEV-Infektion verstanden wird. 50% der Patienten (n=62), die die Frage nach Haustieren beantworteten, hielten vor OLT ein Haustier. Einen Hund besaßen 28% (n=34) und eine Katze 26% (n=32). Außerdem gaben 11% der Patienten (n=13) einen beruflichen Tierkontakt an.

Weder der Haustierkontakt noch der berufliche Tierkontakt korrelierten statistisch signifikant mit der HEV-Seroprävalenz ($p > 0,05$). Patienten, die angaben, vor OLT Haustiere gehalten zu haben, hatten nur eine geringfügig höhere HEV-Seroprävalenz als Patienten ohne Haustierkontakt (21% vs. 20%, $p = 1,00$). Ein Zusammenhang konnte eher im beruflichen Tierkontakt beobachtet werden. Hier hatten Patienten eine tendenziell höhere HEV-Seroprävalenz als Patienten ohne beruflichen Tierkontakt (39% vs. 18%, $p = 0,14$).

3.2.2.2 Essgewohnheiten

Nicht nur über direkten Tierkontakt, auch über den Verzehr von Fleischprodukten kann eine HEV-Infektion erworben werden. 64% der Patienten (n=77) gaben bezüglich ihrer Essgewohnheiten vor OLT an, öfter als 20 Mal pro Monat ein Fleischprodukt konsumiert zu haben und 44% (n=53) konsumierten öfter als 10 Mal im Monat ein Schweinefleischprodukt. 36% der Patienten (n=44) gaben an, vor OLT Wild gegessen zu haben, von denen 6 Patienten Wild mit einer Frequenz von mehr als 10 Mal pro Jahr konsumierten. Zudem aßen 73% der antwortenden Patienten (n=87) vor OLT Innereien und dabei 12% (n=14) öfter als ein Mal pro Monat.

Eine statistisch signifikante Korrelation war alleine im quantitativen Konsum von Innereien zu erheben: Patienten mit einem Konsum von Innereien öfter als ein Mal pro Monat hatten eine statistisch signifikant höhere anti-HEV IgG-Seroprävalenz als Patienten, die den Konsum von Innereien verneinten (50 vs. 18%, $p = 0,04$). Weiterhin hatten Patienten mit einem Konsum von Wildfleisch öfter als 10 Mal pro Jahr eine höhere HEV-Seroprävalenz als Patienten, die kein Wild konsumierten (33 vs. 19%, $p = 0,60$). Weder der quantitative Fleischkonsum noch der Verzehr von Schweinefleischprodukten waren mit einem signifikant höheren HEV-Infektionsrisiko assoziiert (s. Tab. 8).

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der Evaluation von Risikofaktoren, welche für eine zoonotische Genese der HEV-Infektion sprechen, in der vorliegenden Arbeit kaum statistisch signifikante Zusammenhänge. Lediglich ein erhöhter Konsum von Innereien war mit einem höheren Risiko einer HEV-Infektion vergesellschaftet.

3.2.2.3 „Sonstige Risikofaktoren“

In Tabelle 8 sind außerdem Risikofaktoren dargestellt, die im Fragebogen unter „Sonstige Risikofaktoren“ zusammengefasst wurden. Der Schwerpunkt lag hier auf einer möglichen sexuellen bzw. intravenösen (i.v.) Übertragung des HEV. 37% der antwortenden Patienten (n=45) erhielten im Zeitraum vor OLT mindestens eine Bluttransfusion und für 3% (n=3) wurde ein i.v.-Drogenabusus dokumentiert. Außerdem gaben 83 Patienten (70%) an, weniger als 10 Sexualpartner bis zum Zeitpunkt der OLT gehabt zu haben, während 35 Patienten (30%) mehr als 10 Sexualpartner hatten. Diese hatten eine statistisch signifikant ($p=0,04$) höhere HEV-Seroprävalenz als solche mit einer Anamnese von weniger als 10 Sexualpartnern (31 vs. 15%, $p=0,04$). Es gab keine weiteren statistisch signifikanten Zusammenhänge.

Außerdem wurde die vorbeschriebene Risikoexposition durch Abwässer und durch Reisen in Endemiegebiete evaluiert. Eine Reise in ein HEV-endemisches Gebiet unternahmen 40% (n=48) und einen beruflichen Kontakt zu Abwässern hatten 13% (n=16) der Patienten. In der vorliegenden Arbeit war der berufliche Kontakt zu Abwässern mit einem höheren Infektionsrisiko assoziiert; der Unterschied war jedoch nicht signifikant (HEV-Seroprävalenz 31 vs. 19%, $p=0,32$). Keinen signifikanten Unterschied in der HEV-Seroprävalenz gab es zwischen Patienten mit der Reiseanamnese in eine HEV-endemische Region und solchen, die noch nicht in ein HEV-endemisches Land gereist waren (23 vs. 19%, $p=0,65$).

3.2.3 Zusammenhang mit anderen viralen Hepatitiden – anti-HEV IgG positiv vs. negativ getestete Patienten

Um indirekte Hinweise auf Transmissionswege zu erhalten, wurde in der ELISA-Kohorte (n=150) der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Antikörpern gegen die viralen Hepatitiden A, B und C und HEV IgG-Antikörpern überprüft. Serumproben von 31 Patienten innerhalb der ELISA-Kohorte (21%) waren vor OLT anti-HCV positiv, bei

41 Patienten (28%) konnte anti-HBc nachgewiesen werden. Bei 104 Patienten (73%) wurden vor OLT HAV-Antikörper positiv getestet (eine Tabelle ist dem Anhang der Arbeit beigelegt).

Dabei konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden. Patienten mit einem positiven HAV-Antikörper-Status wiesen eine höhere anti-HEV Seroprävalenz auf als anti-HAV negativ getestete Patienten (22 vs. 13%, $p=0,25$). Hingegen korrelierte der anti-HCV Nachweis mit einer niedrigeren HEV-Seroprävalenzrate (13 vs. 22%, $p=0,32$). Für anti-HBc positiv getestete Patienten gab es keine Unterschiede in der anti-HEV-Seroprävalenz im Vergleich zu anti-HBc negativ getesteten Patienten (22 vs. 20%, $p=0,82$).

3.3 Ergebnisse des HEV-RNA-Screenings (n=406)

Mit Hilfe eines RNA-Screenings zu den Zeitpunkten Monat 6 nach OLT sowie zu einem 6 Monate späteren Zeitpunkt sollte in einer repräsentativen Kohorte eines nichtendemischen Landes die Inzidenz der akuten sowie der chronischen HEV-Infektion ermittelt werden. Für das HEV-RNA-Screening wurden alle konsekutiven Patienten, die im Zeitraum 2001–2006 eine OLT erhalten hatten und von denen zumindest 2 Serumproben zu den Zeitpunkten 6 Monate und mehr als 12 Monate nach OLT vorhanden waren, eingeschlossen. Erfolgte in einer Serumprobe der HEV-RNA-Nachweis, so wurden alle weiteren vorliegenden Serumproben des jeweiligen Patienten auf HEV-RNA getestet und eine Sequenzanalyse sowie ein phylogenetischer Vergleich durchgeführt. Es wurden die Serumproben von 406 Patienten nach OLT untersucht. Diese Gruppe schließt auch alle 150 Patienten der ELISA-Kohorte mit ein. Von allen auf das Vorliegen von HEV-RNA getesteten Patienten ($n=406$) wurden 2 Patienten positiv auf HEV-RNA getestet (0,5%). Dabei handelte es sich in beiden Fällen um eine HEV-Genotyp 3-Infektion. Bei einem Patienten erfolgte der Nachweis einer akuten, selbstlimitierenden HEV-Infektion (Patient 1), während beim zweiten Patienten (im Folgenden als Patient 4 bezeichnet) eine chronische HEV-Infektion diagnostiziert wurde. Patient 1 gehörte dabei zur ELISA-Kohorte (s.u. 3.1.9.1), während von Patient 4 initial HEV-RNA bestimmt wurde und serologische Untersuchungen erst im Anschluss durchgeführt wurden.

3.3.1 Patient 4 – eine chronische HEV-Infektion nach Retransplantation

Es handelt sich um eine 40-jährige Patientin, die aufgrund einer autoimmunbedingten Leberzirrhose auf dem Boden einer autoimmunen Hepatitis 2001 erstmals lebertransplantiert wurde. Hepatobiliäre Komplikationen (rezidivierende biliäre Abszesse bei „ischemic type biliary lesions“ nach Verschluss der Leberarterie) machten eine Retransplantation im Januar 2009 notwendig. Die folgenden Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitraum nach Retransplantation (Re-OLT) im Jahr 2009. Der ALT-, Bilirubin-, anti-HEV- und HEV-RNA-Verlauf sind in Abbildung 17 dargestellt.

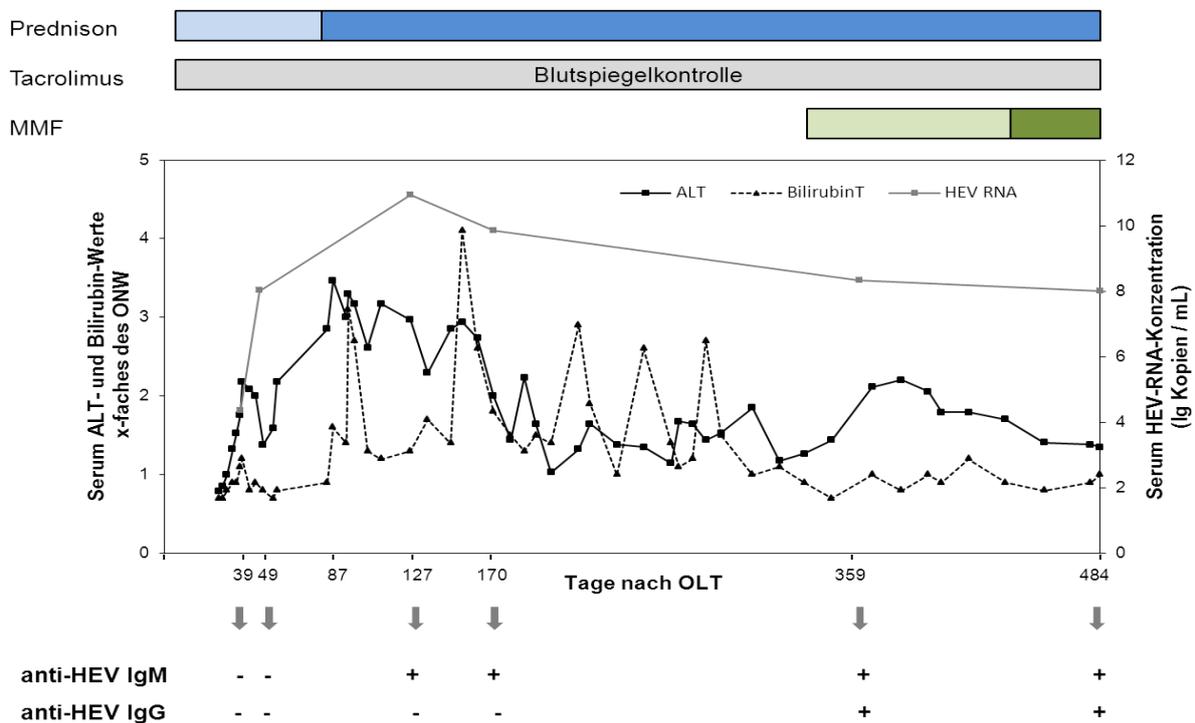


Abbildung 17: Verlauf der chronischen HEV-Infektion bei Patient 4. ALT- und Gesamtbilirubin-Werte sind als x-faches des oberen Normwertes (ONW) angegeben, die HEV-RNA ist logarithmisch aufgetragen. Anti-HEV IgM- und IgG-Ergebnisse sind zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten aufgezeigt. Die initiale Immunsuppression bestand aus Thymoglobulin (nicht dargestellt) und Prednison (Reduktionsschema, hellblauer Balken). Die Prednison-Dosis wurde kontinuierlich reduziert und betrug ab Tag 87 nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) 5 mg/Tag (dunkelblauer Balken). Ab Tag 4 nach OLT wurde Thymoglobulin durch Tacrolimus (Blutspiegelkontrolle, grauer Balken) ersetzt. 11 Monate nach OLT (Tag 323) wurde Mycophenolat-Mofetil (MMF) zum immunsuppressiven Schema hinzugefügt. Zunächst in einer Dosierung von 1 g/Tag (hellgrüner Balken) und ab Tag 396 nach OLT in einer Dosierung von 1,5 g/Tag (dunkelgrüner Balken).

Anti-HEV IgM wurde erstmals zu Monat 5 nach Re-OLT (Tag 127) positiv getestet und anti-HEV IgG zu Monat 12 nach Re-OLT (Tag 359) (zwischen Tag 170 und 359 nach Re-OLT lagen keine weiteren Serumproben des Patienten vor). Beide Antikörper blieben positiv bis zur letzten untersuchten Serumprobe zu Monat 16 (Tag 484). HEV-

RNA wurde erstmals zu Monat 2 nach Re-OLT (Tag 39) nachgewiesen und blieb über den gesamten Verlauf positiv (bis Tag 484 nach Re-OLT). Dabei zeigte eine quantitative HEV-RNA-Untersuchung konstant hohe Replikationswerte mit einem Maximum zu Monat 5 nach Re-OLT (Tag 127) ($8,6 \times 10^{10}$ Kopien / ml). Serumproben vor der Retransplantation 2009 waren sowohl für HEV-RNA als auch für HEV-Antikörper negativ. Es handelt sich also um eine nach Re-OLT erworbene chronische HEV-Infektion.

Aufgrund erhöhter Leberenzymwerte und Cholestase-Parameter wurde 11 Tage nach Re-OLT eine Leberbiopsie durchgeführt, die eine zelluläre Rejektion Grad 1 zeigte. Daraufgehend applizierte man 3 Tage lang Methylprednison (Urbasone[®], Sanofi Aventis, 500 mg/Tag) intravenös, woraufhin die AST- (Aspartat-Aminotransferase) und ALT-Werte kontinuierlich zurückgingen. AST-Werte normalisierten sich vorübergehend an Tag 17 nach Re-OLT und ALT-Werte an Tag 25 nach Re-OLT. Im weiteren Verlauf lagen die Transaminasen-Werte ausschließlich zwischen Tag 28 und 32 nach OLT im Normbereich (nicht abgebildet) und während des gesamten weiteren Verlaufs außerhalb des Normbereiches.

Die initiale Immunsuppression bestand aus Thymoglobulin und Prednison (Reduktionsschema). Zum 4. Tag nach Re-OLT wurde Thymoglobulin durch Tacrolimus (Blutspiegelkontrolle) ersetzt und 11 Monate nach Re-OLT (Tag 323) Mycophenolat-Mofetil (MMF) zum immunsuppressiven Schema hinzugefügt (s. Abb. 17).

Ein biliäres Leck wurde als Transplantations-Komplikation diagnostiziert und am 14. Tag nach Re-OLT im Rahmen einer ERCP-Intervention (endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) behandelt. Ein Stent wurde an Tag 15 nach Re-OLT gelegt und an Tag 36 nach Re-OLT wieder ausgelassen. Dennoch ist die Patientin im Abstand von 2 Monaten auf ERC's (endoskopisch retrograde Cholangiographien) angewiesen. Klinisch beschrieb die Patientin einen zu Monat 4 (Tag 105) beginnenden Juckreiz und ein Sklerenikterus wurde zu Monat 6 nach Re-OLT dokumentiert. Diese klinischen Befunde stehen im Einklang mit den zeitgleich erhöhten Bilirubin-Werten. Aufgrund der begleitenden hepatischen sowie biliären Erkrankungen der Patientin kann allerdings ein Zusammenhang zwischen der HEV-Infektion und den klinischen Symptomen sowie den erhöhten Leberparametern nur schwer getroffen werden.

Außerdem ist für die Patientin die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten ca. einen Monat vor der Retransplantation dokumentiert. Hier konnte nicht geklärt werden, ob es

eine mögliche Übertragung über kontaminierte Blutprodukte gab, da keine Proben zur diagnostischen Abklärung zur Verfügung standen.

3.4 Eine chronische HEV-Infektion durch ein infiziertes Spenderorgan bei einem Patienten, der außerhalb der PCR-Kohorte auf HEV getestet wurde

Im Folgenden soll ein weiterer Patient (Patient 5) vorgestellt werden, der im Rahmen von Kontrolluntersuchungen nach OLT mit persistierend hohen Transaminasen-Werten auffiel, ohne dass hierfür ein klinisch-pathologisches Korrelat gefunden werden konnte. Dieser Patient wurde außerhalb der PCR-Kohorte auf HEV untersucht. Es handelt sich um einen 73-jährigen männlichen Patienten, der aufgrund eines Hepatozellulären Karzinoms bei einer vermutlich NASH-bedingten (NASH, nichtalkoholische Steatohepatitis) Leberzirrhose im Dezember 2008 lebertransplantiert wurde. Der serologische sowie laborchemische Infektionsverlauf ist in Abbildung 18 dargestellt. Eine HEV-Untersuchung wurde erstmals im Februar 2010 (Monat 26 nach OLT) durchgeführt. Hier wurde bei positiver anti-HEV IgM- und IgG-Serologie HEV-RNA mittels PCR nachgewiesen. Retrospektiv wurden 2 tiefgefrorene Seren des Patienten zum Zeitpunkt Monat 5 nach OLT (Tag 150) untersucht und beide zeigten sowohl für anti-HEV IgM- und IgG-Antikörper als auch für HEV-RNA ein positives Ergebnis. Da die Serumprobe zum Zeitpunkt der Lebertransplantation keinen Anhalt für eine HEV-Infektion bot, ist von einer HEV-Infektion nach OLT auszugehen.

Klinisch entwickelte der Patient zu Monat 11 nach OLT (Tag 333 nach OLT) Beinödeme sowie einen Aszites. Eine Histologie zu diesem Zeitpunkt (347 Tage nach OLT) wies eine fortgeschrittene Fibrosierung der Leber auf. Im Februar 2010 (Monat 14) zeigte das Labor den Befund einer dekompensierten Lebererkrankung sowie das Vorliegen einer Infektion unklaren Fokus. Im weiteren Verlauf des mittlerweile intensivpflichtigen Patienten wurde im Rahmen einer CT-Untersuchung eine Panenterokolitis befundet und als mögliche Ursache der Sepsis vermutet. Der Patient verstarb 2 Tage nach Klinikeinweisung.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Fremdleberspende und der HEV-Infektion herauszustellen, wurden Blutproben und Leberbiopsien des Transplantatspenders auf Antikörper sowie HEV-RNA untersucht. Erstaunlicherweise konnte in der Leberprobe des Spenders HEV-RNA zum Zeitpunkt vor OLT

nachgewiesen werden, während Serumproben des Spenders sowohl für HEV-RNA als auch für HEV-Antikörper negativ waren. Das virale Genom der Patienten-Serumprobe und der Spender-Gewebsprobe wurde sequenziert und es handelte sich in beiden Fällen um den Genotypen bzw. Subtypen 3e. In diesem Kontext konnte eine Sequenzidentität von > 99% nachgewiesen werden, sodass eine Übertragung des HEV durch das infizierte Spenderorgan angenommen wurde. Dieser Fall wurde im Journal of Hepatology 2011 publiziert [66].

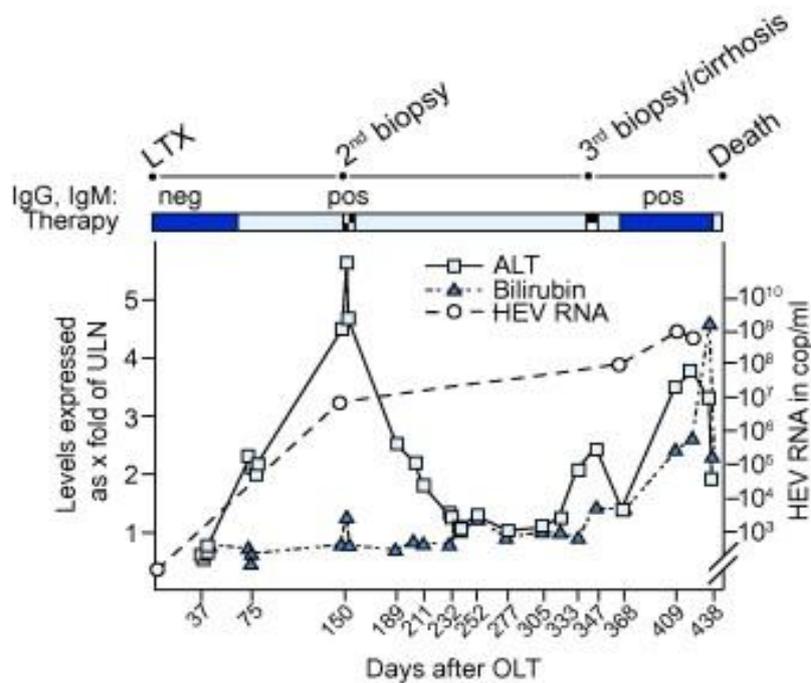


Abbildung 18: ALT-, Bilirubin- und HEV-RNA-Verlauf von Patient 5, der aufgrund einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) lebertransplantiert wurde. Es handelt sich um eine chronische Infektion, die innerhalb eines Jahres zu einer Zirrhose geführt hat. Die initiale Immunsuppression bestand aus Prednisolon (Reduktionsschema), Tacrolimus (4 mg/Tag) und Rapamycin (4 mg/Tag) (dunkelblaue Balken). Die immunsuppressive Erhaltungstherapie ist in Form eines hellblauen Balkens dargestellt und bestand aus Tacrolimus sowie Rapamycin. Die zusätzliche intravenöse Methylprednisolon-Bolusgabe (500 mg/Tag für die Dauer von 5 Tagen) ist in Form eines schwarz-weißen Kästchens dargestellt. Der ALT- und Bilirubin-Verlauf ist als x-faches des oberen Normwertes (*engl.*, x fold the upper limit of normal; ULN) graphisch dargestellt. Waren anti-HEV Antikörper und HEV-RNA zum Transplantationszeitpunkt noch negativ, so lag 150 Tage sowie 420 Tage nach OLT ein positives Ergebnis für diese Parameter vor [66].

4 Diskussion

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die klinische Bedeutung der HEV-Infektion für Patienten, die zwischen 2001 und 2006 am Campus Virchow-Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin lebertransplantiert wurden, evaluiert.

Ein Ziel der Arbeit war es, die Inzidenz der akuten sowie chronischen HEV-Infektion bei Patienten nach Lebertransplantation zu untersuchen. Ein mittels Real-Time PCR durchgeführtes RNA-Screening konnte den HEV-RNA-Nachweis bei 2 von 406 Patienten erbringen (0,5%). Auch das Risiko einer chronischen HEV-Infektion konnte bestätigt werden: 1 Patient mit nachgewiesener akuter HEV-Infektion entwickelte einen chronischen Infektionsverlauf.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, unter Einsatz eines ELISA-Testverfahrens, die HEV-Seroprävalenz in einem nichtendemischen Land zu bestimmen sowie – erstmals – den Antikörperverlauf in einer Subkohorte von 150 Patienten vor und zu den Zeitpunkten Monat 6, 12 und 36 nach Lebertransplantation zu beobachten. Die ermittelte anti-HEV Seroprävalenz war hoch und betrug 21% (n=31). 28 Patienten (19%) wiesen bereits zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positive Serumproben auf, während 3 Patienten erst nach OLT seropositiv getestet wurden (2%). Das dynamische Antikörperscreening zeigte weiterhin, dass 20 Patienten zu allen Untersuchungszeitpunkten seropositive Proben aufwiesen (Gruppe 1; 13%), während 7 Patienten nur vor OLT anti-HEV IgG positive Serumproben aufwiesen und unter Immunsuppression nach OLT seronegativ getestet wurden (Gruppe 2; 5%).

Außer einer fäkal-oralen Transmission des HEV in Entwicklungsländern lassen erste Daten in der Literatur eine Infektion über kontaminierte Fleischprodukte vermuten. Mit Hilfe eines Fragebogens wurden für Patienten der ELISA-Kohorte (n=150) Risikofaktoren für den Erwerb einer HEV-Infektion definiert. Diesbezüglich konnten der häufige Verzehr von Innereien sowie häufig wechselnde Sexualpartner als statistisch signifikante Risikofaktoren herausgestellt werden.

Nachfolgend sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kritisch beleuchtet und diskutiert werden.

4.1 Diskussion der Ergebnisse des HEV-Antikörperscreenings

4.1.1 Die HEV-Seroprävalenz in einem nichtendemischen Land

Obwohl die akute HEV-Infektion in Deutschland und in anderen Industrieländern eine selten diagnostizierte Erkrankung ist, liegen Daten vor, die auf eine häufige Exposition gegenüber HEV in nichtendemischen Regionen hindeuten [45;67].

Unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen ELISA-Testkits (Fa. Mikrogen) betrug die anti-HEV IgG-Seroprävalenz in einer Kohorte von 150 Patienten (ELISA-Kohorte) 21% (n=31). 19% der Patienten (n=28) wurden bereits zum Zeitpunkt vor OLT seropositiv getestet, sodass diese Zahl mit Seroprävalenzdaten aus der Allgemeinbevölkerung besser vergleichbar ist. Es muss dennoch berücksichtigt werden, dass sich die untersuchte Kohorte aus Patienten mit schweren Lebererkrankungen zusammensetzte, die möglicherweise ein erhöhtes Risiko für den Erwerb einer HEV-Infektion besaßen.

Studien haben gezeigt, dass HEV-Seroprävalenzdaten zwischen nichtendemischen Ländern stark variieren und eine Spannweite von 1% [44] bis über 20% [45;67] aufweisen. Somit liegt das Ergebnis der vorliegenden Arbeit im Bereich der Spannweite vorangegangener Studien. Bei Patienten nach Organtransplantation eines nichtendemischen Landes ist die Spannweite der erhobenen Seroprävalenzdaten ebenfalls groß und liegt zwischen 3 und 14% [3-5]. Im Vergleich mit diesen Studien ist die in der vorliegenden Arbeit ermittelte HEV-Seroprävalenz hoch; insbesondere im Vergleich mit der in Deutschland von Pischke et al. beobachteten Seroprävalenz von 4% bei Patienten nach Lebertransplantation an der Universitätsklinik Hannover [4]. Pischke et al. haben jedoch ausschließlich Seren von Patienten zum letzten Zeitpunkt nach Transplantation untersucht. Auch Haagsma et al. untersuchten die aktuelle Serumprobe von Patienten nach Lebertransplantation und ermittelten eine Seroprävalenzrate von 3% [5]. Kamar et al. haben ein anti-HEV IgG-Screening zum Zeitpunkt der Organtransplantation durchgeführt und eine Seroprävalenzrate von 14% ermittelt [3]. Wir konnten in Einklang mit diesen Daten zeigen, dass die Seroprävalenzraten nach Transplantation abnehmen, was wahrscheinlich auf den Effekt der Immunsuppression zurückzuführen ist: Zum Untersuchungszeitpunkt vor OLT betrug die Seroprävalenzrate 19% und zum letzten Untersuchungszeitpunkt, Monat 36, 14%. Somit stellt das Studiendesign einen möglichen Grund für die beobachteten Differenzen zu den anderen HEV-Seroprävalenzstudien dar.

Außerdem müssen auch unterschiedliche Sensitivitäten der zur Verfügung stehenden anti-HEV Testsysteme berücksichtigt werden. Nachstehend soll dieser Sachverhalt näher beleuchtet werden.

4.1.1.1 Einfluss des serologischen Testsystems auf die Seroprävalenzrate

Um Antikörper gegen das HEV nachzuweisen, sind ELISA-Testsysteme Verfahren der 1. Wahl. Es gibt kommerziell erhältliche ELISA-Testsysteme verschiedener Hersteller, die sich in der Antigenzusammensetzung unterscheiden. Als ein Grund für die große Spannweite von Seroprävalenzdaten zwischen nichtendemischen Ländern vermutet man eine große Varianz in der Güte der zur Verfügung stehenden serologischen Testsysteme. Interessanterweise konnten Mansuy et al. demonstrieren, dass die Seroprävalenz von HEV bei Blutspendern im Südwesten Frankreichs von 16% [68] auf 53% [67] anstieg, als ein vermeintlich sensitiverer Test (der Firma Wantai) verwendet wurde. Dass die Testgüte zwischen kommerziell erhältlichen ELISA-Testsystemen stark schwankt, wurde auch im Rahmen anderer Studien bestätigt [46-48]. Dieser Umstand erschwert es, die mit Hilfe eines kommerziellen Testkits der Firma Mikrogen erhobene Seroprävalenzrate der vorliegenden Studie mit denen von anderen Seroprävalenzstudien zu vergleichen: Kamar und Pischke et al. verwendeten einen ELISA der Firma Abbott [3;4], Mansuy et al. einen ELISA der Firma Wantai [67] und Haagsma et al. einen der Firma Genelabs [5].

Die Ursache für die differierende Testgüte zwischen den verschiedenen ELISA-Testsystemen ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Man geht davon aus, dass sie zum einen in der genetischen Heterogenität des HEV, zum anderen in der Komplexität der antigenetischen Charakteristika der HEV-Proteine liegt [69-70]. Es werden aktuell verschiedene synthetisch produzierte Peptide sowie rekombinante Antigene des ORF2- und ORF3-Proteins der HEV-Genotypen 1, 2 und 3 für die Herstellung kommerziell erhältlicher serologischer Testverfahren verwendet. Von allen bisher untersuchten HEV-Antigenen scheint das C-terminale Ende des ORF2-Proteins das höchste antigenetische Potenzial zu besitzen [71-72]. Es konnte demonstriert werden, dass Epitope des ORF2-Proteins konformationsabhängig sind [70;73] und dass sich antigenetische Eigenschaften des ORF2-Proteins in Abhängigkeit vom HEV-Genotyp unterscheiden [74]. In der vorliegenden Studie konnte die Relevanz des ORF2-Proteins für die serologische Diagnostik bestätigt werden. Betrachtet man die

spezifische Bandenverteilung der positiven Westernblots (n=45), wird deutlich, dass das C-terminale Ende des ORF2- Proteins ein sehr empfindlicher Marker für den Nachweis von anti-HEV IgG ist. Diese Bande reagierte in 44 von 45 positiven Westernblots positiv und einmal grenzwertig.

Aus den Daten geht hervor, dass weitere Studien zur Evaluierung der ELISA-Testverfahren notwendig sind, um ihre Validität zu erhöhen. Eine Standardisierung von serologischen Testverfahren würde die Interpretation von Seroprävalenzdaten wesentlich erleichtern. Außerdem lässt sich ableiten, dass bei Patienten nach Organtransplantation die Diagnose einer HEV-Infektion durch serologische Testverfahren nicht zuverlässig getroffen werden kann. Der Nachweis von HEV-RNA im Serum oder im Stuhl des Patienten gilt als Goldstandard und sollte bei Verdacht auf eine akute oder chronische HEV-Infektion durchgeführt werden.

4.1.1.2 Einfluss des Wohnortes auf die HEV-Seroprävalenzrate

Nicht nur zwischen verschiedenen nichtendemischen Ländern variieren die Seroprävalenzdaten beträchtlich, sondern auch innerhalb eines Landes. Der Südwesten Frankreichs stellt eine endemische HEV-Region dar, in der Mansuy et al. eine HEV-Seroprävalenzrate von über 50% ermittelt haben [68]. Als Ursache für regionale Differenzen werden bestimmte Risikofaktoren für die HEV-Transmission vermutet, die in den verschiedenen Regionen unterschiedlich stark ausgeprägt sind.

Die Auswertung der demographischen Daten ergab, dass das Wohnen in einer Großstadt (> 100.000 Einwohner), im Vergleich zum Wohnen in einem Ort mit weniger als 20.000 Einwohnern, mit einem signifikant höheren HEV-Infektionsrisiko assoziiert war. Patienten, die zum Transplantationszeitpunkt in einem Wohnort mit mehr als 100.000 Einwohnern lebten, hatten eine anti-HEV IgG-Seroprävalenz von 28%, während die HEV-Seroprävalenzrate bei Patienten aus einem Wohnort mit weniger als 20.000 Einwohnern 10% betrug ($p=0,03$). Außerdem wurde für Patienten, die zum Transplantationszeitpunkt in Berlin lebten (n=77) eine, wenngleich nicht signifikant, höhere Seroprävalenz beobachtet als für Patienten aus der Region Brandenburg (n=30) oder anderen Bundesländern (n=42). Die geringe Zahl der Patienten aus anderen Bundesländern ermöglicht keine zuverlässigen Aussagen zu möglichen Unterschieden in der HEV-Seroprävalenz zwischen diesen unter „Sonstige“ gelisteten Bundesländern.

Sowohl Wichmann et al. als auch Kuniholm et al. stellten heraus, dass das HEV-Infektionsrisiko in einem Industrieland mit der Bevölkerungszahl steigt [45;63]. Kuniholm et al. vermuten, dass Menschen aus städtischen Regionen eher in Entwicklungsländer reisen [45]. Die im Rahmen der Globalisierung entstandene Multiethnizität kann weiterhin ein Grund für eine höhere HEV-Seroprävalenz in urbanen Regionen im Vergleich zu ländlichen Regionen in Industrieländern darstellen. Insbesondere in der Region Berlin, in der ein relevanter Bevölkerungsanteil einen Migrationshintergrund besitzt, kann dieser Umstand zu höheren Seroprävalenzdaten führen. Hierfür spricht, dass in der vorliegenden Arbeit Patienten, die aus der Türkei, einer HEV-endemischen Region, stammten (n=10), mit 40% eine höhere anti-HEV IgG-Seroprävalenz aufwiesen als in Deutschland geborene Patienten (n=112; Seroprävalenzrate 20%). Dieser Zusammenhang zeigte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,22$). In der Studie von Pischke et al., die an der Universitätsklinik in Hannover durchgeführt worden ist, gibt es keine detaillierten demographischen Daten zu den Studienteilnehmern, sodass die hier getroffenen Erklärungsversuche spekulativ bleiben.

Ein möglicherweise plausiblerer Grund für den beobachteten regionalen Unterschied zur Seroprävalenzrate von Pischke et al. könnte außerdem in der zoonotischen Genese der HEV-Infektion liegen. Interessanterweise zeigte eine deutsche Studie zur HEV-Prävalenz bei Wildschweinen, dass sich HEV-RNA-Prävalenzen bei Wildschweinen in verschiedenen Regionen Deutschlands signifikant voneinander unterscheiden [75]. So hatten Wildschweine aus der Region Brandenburg eine höhere HEV-RNA-Prävalenz als Wildschweine aus Rheinland Pfalz, Sachsen-Anhalt und Baden-Württemberg. Da der Konsum von Wildschweiflesch sowie von Innereien (v.a. Leber) als wesentlicher Risikofaktor für die HEV-Infektion in nichtendemischen Regionen gilt, könnte dieser Sachverhalt für den beobachteten Unterschied zur Studie von Pischke et al. beigetragen haben.

Es wird deutlich, dass die Durchführung weiterer Studien notwendig ist, welche zum besseren Verständnis von unterschiedlich hohen Seroprävalenzraten zwischen nichtendemischen Ländern sowie innerhalb eines Landes beitragen.

4.1.2 Die Avidität der zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Serumproben

Mit Hilfe des HEV-Antikörperscreenings konnte demonstriert werden, dass innerhalb der ELISA-Kohorte (n=150) bei 28 von 31 seropositiv getesteten Patienten bereits zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positive Serumproben vorlagen. Um Hinweise auf den Infektionszeitpunkt dieser Patienten zu erhalten, wurden Aviditätstestungen durchgeführt. Die Avidität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen. Im Rahmen einer Westernblot-Untersuchung diffundieren niedrigavide Antikörper, die eher im Rahmen einer (post)akuten Infektion gebildet werden, durch das Hinzufügen von Aviditätslösung ab, während hochavide Antikörper am Teststreifen gebunden bleiben. Man berechnet den Aviditätsindex, wobei ein Aviditätsindex von $< 0,5$ (nach Angaben des Herstellers) auf einen frühen Infektionszeitpunkt hinweisen könnte.

Von allen 28 Patienten, die zum Zeitpunkt vor OLT ein positives anti-HEV IgG-Ergebnis aufwiesen, hatten 24 Patienten (86%) einen Aviditätsindex $> 0,5$ und 4 Patienten (14%) einen Aviditätsindex von $0,5$. Somit lieferten die Ergebnisse der Aviditätstestung in der vorliegenden Arbeit keinen Hinweis auf eine frische Infektion und deuten darauf hin, dass sich die Patienten an einem länger zurückliegenden Zeitpunkt mit HEV infizierten. Das Aviditätsergebnis erlaubt jedoch keine präzise Einschätzung des Infektionszeitpunktes, sodass anhand dieser Daten über die Dauer der anti-HEV IgG-Persistenz im menschlichen Organismus keine zuverlässige Aussage getroffen werden kann. Bezüglich der Dauer der IgG-Antikörperpersistenz ist die Datenlage bisher nicht eindeutig. Es wurde sowohl eine Antikörperpersistenz über einen Verlaufszeitraum von 14 Jahren beobachtet [29] als auch ein signifikanter Abfall des anti-HEV IgG-Titers nach 14 Monaten [30].

4.1.3 Patienten mit Verlust von HEV-Antikörpern nach Lebertransplantation

Das sequentielle Antikörperscreening zeigte weiterhin, dass von den 28 zum Zeitpunkt vor OLT seropositiv getesteten Patienten 20 Patienten zu allen weiteren Untersuchungszeitpunkten seropositive Serumproben aufwiesen (Gruppe 1). Hingegen wurden 7 Patienten ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getestet

und wiesen zu den Untersuchungszeitpunkten nach OLT anti-HEV IgG negative Serumproben auf (Gruppe 2). Nachstehend sollen anhand der durchgeführten Untersuchungen Ursachen für den unterschiedlichen Antikörperverlauf zwischen diesen beiden Gruppen erörtert werden.

Betrachtet man die Auswertung der im ELISA bestimmten anti-HEV IgG-Konzentrationen (U/ml), wird die Auswirkung der immunsuppressiven Therapie auf den Antikörpertiter deutlich. Sowohl bei den durchgehend anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 1) als auch bei Patienten, die ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getestet wurden (Gruppe 2), kam es erwartungsgemäß vom Zeitpunkt vor OLT zum ersten Verlaufszeitpunkt Monat 6 nach OLT zu einem signifikanten Abfall der anti-HEV IgG-Konzentration ($p < 0,05$). Nachfolgend blieb der Antikörpertiter zu Monat 12 und 36 nach OLT in jeder Gruppe nahezu unverändert. Die Höhe des Antikörpertiters vor Beginn der immunsuppressiven Therapie scheint dabei entscheidenden Einfluss auf das anti-HEV ELISA-Ergebnis nach Transplantation bzw. Immunsuppression zu haben: Patienten der Gruppe 1 wiesen zum Zeitpunkt vor OLT mit 69 U/ml eine signifikant höhere anti-HEV IgG-Konzentration auf als Patienten der Gruppe 2, deren Serumproben nach OLT anti-HEV IgG negativ getestet wurden (29 U/ml; $p < 0,01$). Außerdem war der Quotient aus Tacrolimuspiegel (ng/ml) und anti-HEV IgG-Konzentration im ELISA (U/ml) zum Zeitpunkt Monat 6 nach OLT bei Patienten der Gruppe 2 signifikant höher als bei Patienten der Gruppe 1 (0,17 ng/ml / U/ml in Gruppe 1 vs. 0,97 ng/ml / U/ml in Gruppe 2; $p < 0,01$). Es lässt sich ableiten, dass die Höhe der medikamentösen Immunsuppression mit der Abnahme der Antikörpertiter korreliert. Der Verlust der anti-HEV Positivität kann daher am ehesten durch eine Immunsuppression-vermittelte Reduktion der anti-HEV IgG-Konzentration erklärt werden. Bisher liegen – soweit bekannt – keine vergleichbaren Daten für anti-HEV IgG positiv getestete Patienten unter Immunsuppression vor. Die Ursache für die zwischen Gruppe 1 und 2 signifikant unterschiedlichen Antikörpertiter vor Beginn der immunsuppressiven Therapie liegt möglicherweise in der individuell unterschiedlich stark ausfallenden Antikörperantwort bei Erstinfektion.

Ein wichtiges Ergebnis ist in diesem Zusammenhang, dass die anti-HEV IgG-Westernblot-Untersuchungen von Patienten der Gruppe 2 ($n=7$) zu den Zeitpunkten Monat 6 und 12 nach OLT (zu denen diese Patienten im ELISA anti-HEV IgG negativ getestet wurden) bei 6 bzw. 5 Patienten ein positives Ergebnis ergaben. Dieses

Ergebnis bestätigt die höhere Sensitivität des HEV-Westernblots und könnte auf einen zu hohen Cutoff-Wert im HEV-ELISA (desselben Herstellers: Mikrogen) hindeuten. Die Frage, inwieweit bei diesen anti-HEV IgG-Konzentrationen ein protektiver Schutz vor einer Neuinfektion besteht, kann hier nicht beantwortet werden. Ein Grund für die höhere Sensitivität des Westernblots gegenüber dem ELISA liegt darin, dass beim Westernblot-Verfahren die Antigene alle einzeln und nicht in einem Gemisch auf einem Blotstreifen aufgetragen sind. Außerdem sind sowohl Antigene des Genotyp 1 als auch 3 auf einem Teststreifen aufgetragen (Der ELISA der Firma Mikrogen erfasst nur Antigene des HEV-Genotyp 1), sodass man vermuten kann, die in Deutschland häufig vorzufindenden Antikörper des Genotyp 3 würden besser erfasst werden. Da nur ein HEV-Serotyp beschrieben ist und häufig eine Kreuzreaktivität zwischen den 4 humanpathogenen Genotypen beobachtet werden konnte [76-78], wurde der Bedeutung des verwendeten Genotyps für das serologische Testsystem bisher nur geringe Bedeutung beigemessen. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass sich die ORF2-Antigene in Abhängigkeit vom HEV-Genotyp in ihrem antigenetischen Potenzial unterscheiden. Im Rahmen einer kürzlich von Osterman et al. publizierten Studie wurden stärkere Reaktionen des ORF2-Antigens beobachtet, wenn HEV-Genotyp 1-Antigene mit Genotyp 1-Sera bzw. Genotyp 3-Antigene mit Genotyp 3-Sera inkubiert worden sind [74]. Das Ergebnis der Westernblot-Testreihe in der vorliegenden Arbeit unterstützt somit die Hypothese, dass kommerziell erhältliche serologische Testsysteme, die sich hauptsächlich aus HEV-Genotyp 1-Antigenen zusammensetzen, einer Anpassung für Genotyp 3-prädominante Regionen bedürfen [69;74].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass 25% (Gruppe 2; n=7) der zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (n=28) nach OLT anti-HEV negativ werden. Die Wahrscheinlichkeit des Verlustes der anti-HEV Positivität nimmt zu, je niedriger die anti-HEV IgG-Konzentration vor OLT ist. Da die Mehrzahl der Patienten jedoch im Westernblot weiterhin anti-HEV positiv ist, ist dieses Ergebnis hauptsächlich auf die geringe Sensitivität der heutigen anti-HEV ELISA zurückzuführen.

4.1.4 Zum Zeitpunkt nach OLT anti-HEV IgG positiv getestete Patienten

Zu einer HEV-Serokonversion nach OLT ist es bei drei der 119 vor OLT anti-HEV negativ getesteten Patienten gekommen (2,5%). Dabei zeigten 2 Patienten nur eine einmalige anti-HEV Positivität, während sich bei dem dritten Patienten kontinuierlich nach OLT anti-HEV IgG nachweisen ließ. Eine Detektion von HEV-RNA gelang nur bei dem letztgenannten Patienten. Der serologische Verlauf dieses Patienten (Patient 1) mit initialer Virämie sowie anti-HEV IgM-Antikörperbildung, passagerer Transaminasenerhöhung und im weiteren Verlauf ausschließlich nachweisbaren anti-HEV IgG-Antikörpern ist dabei charakteristisch für eine akute, selbstlimitierende HEV-Infektion.

Die Patienten 2 und 3 wurden ausschließlich zum Untersuchungszeitpunkt Monat 12 nach OLT anti-HEV IgG positiv getestet. Zu den Untersuchungszeitpunkten vor OLT, Monat 6 und Monat 36 nach OLT wurden die Serumproben sowohl für anti-HEV IgM/IgG als auch für HEV-RNA negativ getestet. Zwischen diesen Untersuchungszeitpunkten standen für beide Patienten keine weiteren Serumproben zur Verfügung. Es ist – nach aktuellem Stand – das erste Mal, dass ein derartiger Antikörperverlauf dokumentiert wurde. Für den isoliert positiven anti-HEV IgG-Befund zum Zeitpunkt Monat 12 nach OLT gibt es mehrere mögliche Begründungen.

Man kann ein falsch-positives anti-HEV IgG-Ergebnis vermuten, welches für eine geringe Spezifität der zur Verfügung stehenden ELISA-Testverfahren sprechen würde. Eine HBV-bedingte Zirrhose stellte die Indikation zur Lebertransplantation bei Patient 2 und 12 Monate nach OLT konnte eine rezidivierende HBV-Infektion nachgewiesen werden (HBV-Viruslast von 9064 Kopien/ml). Daher könnte der zu Monat 12 nach OLT isoliert positive anti-HEV IgG-Befund durch eine polyklonale B-Zell-Stimulation verursacht worden sein und definitionsgemäß ein falsch-positives Ergebnis darstellen. Es liegen bisher keine Studien vor, die ein falsch-positives anti-HEV IgG-Ergebnis durch eine HBV-induzierte polyklonale B-Zell-Stimulation beschrieben haben, jedoch sind falsch-positive anti-HEV Befunde bei akuter EBV- und CMV-Infektion vom Hersteller (Mikrogen, Neuried) sowie von Fogeda et al. beschrieben [79]. In kürzlich publizierten Studien aus Südkorea wird zudem auf die Möglichkeit falsch positiver ELISA anti-HEV Befunde bei akuter HAV-Infektion hingewiesen [80-81]. Diese Daten unterstützen die Hypothese einer geringen Spezifität der zur Verfügung stehenden ELISA-Testverfahren [82].

Eine stattgefunden HEV-Infektion kann bei den beiden ausschließlich zum Zeitpunkt Monat 12 nach OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Da zwischen den Untersuchungszeitpunkten keine weiteren Serumproben zur Verfügung standen, könnte die HEV-Infektion zwischen Monat 6 und 12 nach OLT stattgefunden haben. Bei Patient 3 reagierte zudem der HEV-Westernblot zum Zeitpunkt Monat 36 nach OLT positiv und das quantitative ELISA-Ergebnis lag mit 19,5 U/ml nahe am Grenzwert-Bereich (20-24 U/ml). Dieser Befund verdeutlicht die bereits unter 4.1.3 diskutierte geringe Sensitivität des HEV-ELISA's im Vergleich zum HEV-Westernblot.

In der Zusammenfassung kann die Ursache für die ausschließlich zum Zeitpunkt Monat 12 nach OLT isoliert anti-HEV IgG positiv getesteten Serumproben nicht sicher eruiert werden. Die Daten verdeutlichen jedoch die unter 4.1.1.1 diskutierte (s.o.) geringe Testgüte der zur Verfügung stehenden serologischen Testverfahren. Um die Diagnose einer HEV-Infektion sicher stellen zu können, ist der HEV-RNA-Nachweis mittels PCR notwendig, da ein signifikanter Prozentsatz nicht zuverlässig auf die serologischen Tests reagiert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse des HEV-RNA-Screenings in der PCR-Kohorte (n=406) – Inzidenz der akuten und chronischen HEV-Infektion nach OLT

In Industrieländern ist die akute HEV-Infektion eine seltene, aber zunehmend häufiger diagnostizierte Erkrankung. Im Jahr 2010 wurden zwischen Januar und Juli in Deutschland 114 HEV-Fälle an das Robert-Koch-Institut übermittelt. Chronische HEV-Infektionsverläufe sind erstmals 2008 von Kamar et al. [3] und bisher ausschließlich bei Patienten nach Organtransplantation bzw. Patienten mit Immunsuppression nachgewiesen worden. Die chronische HEV-Infektion kann zu einer signifikanten Progredienz der viralen Hepatitis in eine Leberfibrose bzw. Leberzirrhose führen, sodass die klinische Bedeutung der chronischen HEV-Infektion in Industrieländern deutlich zugenommen hat [4;8].

Um die Inzidenz der chronischen HEV-Infektion bei Patienten nach Lebertransplantation zu untersuchen, wurden Serumproben von 406 Patienten zu den Zeitpunkten Monat 6 und einem 6 Monate späteren Untersuchungszeitpunkt mittels Real-Time PCR auf

HEV-RNA untersucht. Erfolgte in einer Serumprobe der HEV-RNA-Nachweis, so wurden alle weiteren vorliegenden Serumproben des jeweiligen Patienten auf HEV-RNA getestet und eine Sequenzanalyse sowie ein phylogenetischer Vergleich durchgeführt.

Ein HEV-RNA-Nachweis gelang bei 2 Patienten (0,5%). Zu den beiden HEV-RNA positiv getesteten Patienten gehören Patient 1 aus der ELISA-Subkohorte und Patient 4. Bei Patient 1 wurde HEV-RNA erstmals zum Zeitpunkt Monat 6 nach OLT positiv getestet und zu den Verlaufszeitpunkten Monat 12 und Monat 36 nach OLT negativ (es standen keine weiteren Serumproben zur Verfügung). Es handelte sich um eine akute, selbstlimitierende HEV-Infektion (s.u. 4.1.4). Bei Patient 4 wurde HEV-RNA erstmals zu Monat 2 nach Re-OLT (Tag 39) nachgewiesen und blieb über den gesamten Verlauf positiv (bis Tag 484 nach Re-OLT), sodass die Diagnose einer chronischen HEV-Infektion gestellt wurde.

Studien, die das Auftreten der akuten und chronischen HEV-Infektion bei Patienten nach Organtransplantation untersucht haben, zeigten differierende Ergebnisse. Kamar et al. haben 2008 bei 14 von 217 Patienten nach Organtransplantation (6%) eine akute HEV-Infektion nachgewiesen; hiervon entwickelten 8 einen chronischen Infektionsverlauf (57%) [3]. Bei Haagsma et al. testeten 2 von 285 Patienten nach Lebertransplantation positiv auf HEV-RNA (0,7%), von denen bei einem Patienten (50%) die Diagnose einer chronischen HEV-Infektion gestellt wurde [5]. In der Studie von Pischke et al. wurden 2 von 226 Patienten nach Lebertransplantation positiv auf HEV-RNA getestet (0,9%); beide entwickelten einen chronischen Infektionsverlauf [4]. Halac et al. führten ein Antikörper- sowie RNA-Screening bei 70 Kindern nach Lebertransplantation durch: Ein Patient wurde positiv auf HEV-RNA getestet (1,4%) und entwickelte eine chronische HEV-Infektion [83]. Im Rahmen einer Querschnittsstudie von Pas et al. aus den Niederlanden wurde bei 1200 Patienten nach Organtransplantation ein HEV-RNA-Screening durchgeführt, in dem 12 Patienten positiv auf HEV-RNA getestet wurden (1%); bei 11 Patienten wurde die Diagnose einer chronischen HEV-Infektion gestellt (92%) [84].

Kamar et al. führten ein HEV-Screening bei Patienten durch, die ohne Nachweis eines pathologischen Korrelates erhöhte Lebertransaminasen-Werte aufwiesen [3]. Auch in den Studien von Pischke und Halac et al. waren die Patienten, die HEV-RNA positiv getestet wurden, Bestandteil einer Subgruppe mit unerklärlicherweise erhöhten Transaminasen nach OLT [4;83]. Dass in einem Kollektiv, in dem die häufigsten

Ursachen für erhöhte Lebertransaminasen ausgeschlossen wurden, die HEV-Infektion häufiger auftrat, ist nachvollziehbar. Haagsma et al., die eine vergleichbare Patientenauswahl vorgenommen haben, ermittelten eine Inzidenz von 0,7% [5], welche mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar ist. Pas et al. nahmen ebenfalls eine vergleichbare Patientenauswahl vor und ermittelten eine HEV-RNA-Prävalenz von 1% [84]. Die Autoren führten retrospektiv ein HEV-RNA-Screening bei Patienten, die zwischen 2000 und 2011 ein Organtransplantat erhielten, durch. Dabei fällt auf, dass die Mehrzahl der Patienten zu einem relativ späten Zeitpunkt erstmals positiv auf HEV-RNA getestet worden ist: Bei 11 von 12 Patienten lag der Infektionszeitpunkt zwischen 2008 und 2011, während bei einem Patienten der Infektionszeitpunkt auf das Jahr 2003 zurückzuführen war. In der vorliegenden Arbeit ist ein relativ weit zurückliegender Zeitraum (2001-2006) untersucht worden. Dies könnte einen Grund für die im Vergleich zur Studie von Pas et al. niedrigere HEV-RNA-Nachweisrate darstellen. Die Daten lassen vermuten, dass die Infektionshäufigkeit in Industrieländern zunimmt. Auch Daten des Robert-Koch-Institutes deuten auf einen Inzidenzanstieg der HEV-Infektion in nichtendemischen Ländern hin (s. Tab. 1). Ob es sich hierbei um einen wahren Inzidenzanstieg handelt, oder wie Pischke et al. vermuten, um ein gestiegenes klinisches Bewusstsein und infolgedessen häufigerer Diagnostik [20], bleibt abzuwarten. In Anbetracht der Tatsache, dass in der vorliegenden Kohorte der Zeitraum zwischen beiden Serumproben im Durchschnitt 43 Monate betrug, ist nicht auszuschließen, dass weitere Patienten eine akute oder auch chronische HEV-Infektion zwischen diesen beiden Untersuchungszeitpunkten durchgemacht haben. Im Vergleich zu Statistiken des Robert-Koch-Institutes ist die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Inzidenz der HEV-Infektion dennoch hoch. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass die Mehrzahl der HEV-Infektionen in Industrieländern wahrscheinlich klinisch stumm oder subklinisch verläuft und im klinischen Alltag keine weitere serologische bzw. virologische Diagnostik erfolgt [20]. Dafür spricht auch, dass die Zahl neu gemeldeter HEV-Infektionen pro Jahr deutlich kleiner ist als die ermittelten Seroprävalenzdaten.

Einer von 2 HEV-RNA positiv getesteten Patienten zeigte in der vorliegenden Arbeit einen chronischen Infektionsverlauf (Patient 4), was einer Chronifizierungsrate von 50% entspricht. Kamar et al. haben im Rahmen einer retrospektiven Multicenterstudie 85 Patienten mit HEV-Infektion nach Organtransplantation untersucht; 56 Patienten (66%) zeigten einen chronischen Infektionsverlauf [34]. Auch andere Studien ermittelten

Chronifizierungsraten, die im Bereich von 60% lagen [3;5;35] und die mit der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Chronifizierungsrate vergleichbar sind.

Die Stärke der immunsuppressiven Therapie scheint in diesem Zusammenhang ein Risikofaktor für einen chronischen Verlauf zu sein. Kamar et al. konnten zeigen, dass die CD4+ Lymphozyten-Zellzahl bei chronisch infizierten Patienten signifikant niedriger war [3]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Parameter bei den Patienten nicht bestimmt, sodass hierzu keine Aussagen getroffen werden können. Als weitere Risikofaktoren werden eine immunsuppressive Therapie, die Tacrolimus beinhaltet, sowie eine niedrige Anzahl an Blutplättchen vermutet [34]. Aufgrund der niedrigen Fallzahl von Patienten mit nachgewiesener HEV-Infektion in der vorliegenden Arbeit können diese Befunde hier nicht zuverlässig beurteilt werden. Tacrolimus war jedoch sowohl bei Patient 1 mit akuter, selbstlimitierender HEV-Infektion Bestandteil der immunsuppressiven Therapie als auch bei Patient 4 mit chronischem Infektionsverlauf.

Die HEV-RNA positiven Serumproben wurden sequenziert und phylogenetisch analysiert. Bei beiden HEV-RNA positiv getesteten Patienten konnte der HEV-Genotyp 3 nachgewiesen werden. Da die 4 humanpathogenen HEV-Genotypen ein typisches geographisches Verteilungsmuster aufweisen und der Genotyp 3 prädominant in den westlichen Industrieländern vorkommt, ist bei beiden Patienten wahrscheinlich von einer autochton erworbenen HEV-Infektion auszugehen. Hierdurch werden Statistiken des Robert-Koch-Instituts belegt, die zeigen, dass HEV-Infektionen in Deutschland und anderen Industrieländern häufiger autochton erworben sind als durch eine Reise in ein HEV-endemisches Land (s. Tab. 1). Bei Patienten mit Immunsuppression und chronischem HEV-Infektionsverlauf konnte bisher ausschließlich der HEV-Genotyp 3 nachgewiesen werden. Um die Bedeutung der weiteren humanpathogenen HEV-Genotypen für einen chronischen Infektionsverlauf zu evaluieren, werden Studien benötigt, die das Risiko einer chronischen HEV-Infektion bei Patienten mit Immunsuppression in HEV-endemischen Ländern untersuchen.

Zusammenfassend demonstriert das Ergebnis des HEV-RNA-Screenings bei Patienten nach Lebertransplantation, dass die akute HEV-Infektion im Vergleich zu Statistiken des Robert-Koch-Institutes zwar häufiger auftritt, aber dennoch bei dieser Patientengruppe ein seltenes Ereignis ist. Der klinisch stumme Verlauf ist wahrscheinlich der Grund für die große Differenz zwischen selten gemeldeten HEV-Infektionen und hohen

Seroprävalenzdaten in nichtendemischen Ländern. Außerdem wird deutlich, dass bei einem relevanten Anteil von Patienten mit Immunsuppression chronische Infektionsverläufe resultieren können.

4.3 Diskussion der Ergebnisse des epidemiologischen Fragebogens – Risikofaktoren für eine HEV-Infektion in nichtendemischen Ländern

4.3.1 Das Risiko einer zoonotischen Transmission

Die Transmission des HEV in Industrieländern erfolgt in der Mehrzahl der Fälle im Sinne einer zoonotischen Infektion über kontaminierte, tierische Produkte. Insbesondere der rohe Konsum von Wildschweinfleisch und von Innereien ist häufig die Ursache für autochtone Infektionen in nichtendemischen Ländern [45;50;58;63]. Aber auch der direkte Kontakt zu Tieren ist als mögliche Infektionsquelle bzw. Risikofaktor beschrieben [60-62].

Die Auswertung der Patientenbefragung ergab, dass der häufige Konsum von Innereien mit einer signifikant höheren HEV-Seroprävalenz korrelierte: Patienten mit einem Konsum von Innereien öfter als ein Mal pro Monat (n=14) wiesen mit 50% eine statistisch signifikant höhere anti-HEV IgG-Seroprävalenz auf als Patienten, die den Konsum von Innereien verneinten (n=33; 18%, p=0,04). Dieses Ergebnis stimmt mit vorangegangenen Studien überein, in denen ebenso der Verzehr von Innereien mit einem höheren Risiko einer HEV-Infektion assoziiert war [35;45;63]. Bisher konnte sowohl in den USA als auch in den Niederlanden und in Großbritannien HEV-RNA in käuflich erwerblichen Schweinelebern isoliert werden [85-87]. Auch in weiteren europäischen Studien konnte HEV-RNA bei schlachtreifen Schweinen in Stuhl-, Serum- sowie Leberproben festgestellt werden [88-91]. Um einer HEV-Infektion vorzubeugen, sollten deshalb insbesondere Patienten mit Immunsuppression Fleischprodukte ausreichend erhitzen und nach Möglichkeit auf den Verzehr von Innereien verzichten. Es konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass das HEV bei Temperaturen über 70°C inaktiviert wird [92]. Vorher beschriebene Risikofaktoren, wie z.B. der Wildkonsum [56-57] oder ein beruflicher Tierkontakt [60-62] sowie Haustierkontakt [45], waren in der vorliegenden Arbeit statistisch nicht signifikant.

4.3.2 Das Risiko einer parenteralen Transmission

Neben der HEV-Transmission durch infizierte Nahrungsmittel oder Tierkontakt wurden als mögliche Übertragungswege außerdem eine parenterale Infektion über Bluttransfusionen [52] sowie die vertikale Transmission des Virus bei einer Schwangeren auf ihr ungeborenes Kind beschrieben [53]. Bisher gibt es im Gegensatz zur Hepatitis B und C keine Hinweise auf eine sexuelle Transmission des HEV.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig eine statistisch signifikante Korrelation zwischen häufig wechselnden Sexualpartnern und dem HEV-Infektionsrisiko herausgestellt: 35 Patienten gaben an, bis zum Zeitpunkt der OLT mehr als 10 Sexualpartner gehabt zu haben und wiesen mit 31% eine signifikant höhere HEV-Seroprävalenz auf als Patienten mit weniger als 10 Sexualpartnern ($n=83$, HEV-Seroprävalenz=15%, $p=0,04$).

Kuniholm et al. konnten einen Zusammenhang von häufig wechselnden Sexualpartnern [45] mit erhöhten HEV-Seroprävalenzraten nicht identifizieren und auch Keane et al. fanden keine epidemiologischen Hinweise auf einen sexuellen Übertragungsweg für das HEV [93]. Mit 123 an der Patientenbefragung teilgenommenen Patienten ist die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kohorte im Vergleich zur Studie von Kuniholm et al. (>18.000 Teilnehmer) klein [45]. Daher sind die in der vorliegenden Arbeit berechneten Zusammenhänge mit Vorsicht zu interpretieren. Für die Hepatitis A wurde eine erhöhte Inzidenz bei männlichem, homosexuellem Geschlechtsverkehr bereits vor vielen Jahren beschrieben [94-96]. Der genaue Mechanismus des erhöhten Infektionsrisikos konnte nicht nachgewiesen werden. Zu vermuten ist jedoch, dass die asymptomatische Ausscheidung der Hepatitis-A-Viren mit einem erhöhten Infektionsrisiko einhergeht, insbesondere bei männlichem, homosexuellem Geschlechtsverkehr. Da das HEV dem HAV ähnlich ist, könnten für die Hepatitis E ähnliche Grundsätze zutreffen. Der Fragestellung, ob die HEV-Infektion sexuell übertragen werden kann, sollte durch experimentelle sowie weitere epidemiologische Studien nachgegangen werden.

Vorher vermutete Risikofaktoren, wie z.B. eine Bluttransfusionsanamnese, wiesen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit höheren HEV-Seroprävalenzraten und einem somit erhöhten HEV-Infektionsrisiko auf.

4.4 Evaluierung der Persistenz sowie des Reaktivierungsrisikos des HEV

Bei einem Patienten nach Stammzelltransplantation konnte eine Reaktivierung des HEV nachgewiesen werden [64]. Auch vor kurzem publizierte Studien unterstützen die Hypothese einer möglichen Viruspersistenz und somit die Möglichkeit der Reaktivierung, insbesondere bei Patienten mit Immunsuppression. Von unserer Arbeitsgruppe wurde in diesem Zusammenhang ein Artikel publiziert (Patient 5), der erstmals zeigt, dass HEV von einem Spender mit HEV-RNA infizierter Leber, jedoch serologisch okkultem HEV-Status, auf einen Empfänger übertragen werden und sich hieraus eine chronische HEV-Infektion entwickeln kann [66]. Der Fall zeigt, dass HEV in der Leber bzw. im Gallensystem persistieren könnte, ohne eine serologische Antwort auszulösen. Diese Hypothese wird durch eine Seroprävalenzstudie bei Wildschweinen unterstützt: Adlhoch et al. wiesen bei Wildschweinen Seroprävalenzraten von 25-30% nach, während HEV-RNA bei bis zu 68% der Fälle gefunden wurde [75]. Zudem wurde bei einigen Tieren HEV-RNA ausschließlich in der Galle nachgewiesen.

In der vorliegenden Promotionsarbeit gab es jedoch keine Hinweise, die für eine Reaktivierung bzw. eine Persistenz des HEV im menschlichen Organismus sprechen. Patienten, die zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getestet worden sind (n=28), wiesen zu allen Untersuchungszeitpunkten nach OLT HEV-RNA negative Serumproben auf. Auch Abravanel und Kamar et al. konnten bei zum Zeitpunkt vor Stammzelltransplantation und Organtransplantation anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten keine Hinweise auf eine Reaktivierung nach Transplantation gewinnen [97-99]. Aus diesen Daten geht hervor, dass das Risiko einer Reaktivierung des HEV zwar nicht auszuschließen, jedoch sehr gering ist.

Es konnte erstmals eine Transmission von HEV über ein infiziertes Spenderorgan bei okkultem Infektionsstatus des Spenders demonstriert werden. Im Rahmen zukünftiger Studien sollten das Vorkommen von HEV-RNA in Spenderorganen sowie das damit einhergehende Infektionsrisiko genauer untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte hinsichtlich der niedrigen HEV-Inzidenzrate nach OLT evaluiert werden, inwieweit der histologische Nachweis von HEV-RNA im Spenderorgan sinnvoll ist oder ob man das Infektionsrisiko bewusst in Kauf nimmt. Aktuell gibt es keine Leitlinienempfehlungen für die Therapie einer chronischen HEV-Infektion. Es ist jedoch inzwischen gut dokumentiert, dass pegyliertes Interferon [36-38] und Ribavirin [39-42] jeweils in einer

Monotherapie effektive Therapiestrategien darstellen und durch eine Reduktion der immunsuppressiven Therapie in ca. einem Drittel aller Fälle eine Viruselimination erreicht werden kann [33].

5 Zusammenfassung

Die Hepatitis-E-Virus-Infektion (HEV-Infektion) ist eine in Entwicklungsländern endemisch auftretende und in Industrieländern selten diagnostizierte Erkrankung, der bis 2008 ausschließlich ein akuter Verlauf vergleichbar mit einer Hepatitis-A-Virus-Infektion zugeschrieben wurde. Durch die Erstbeschreibung chronischer Infektionsverläufe bei Patienten nach Organtransplantation und die rasche Progredienz der viralen Hepatitis in eine Leberfibrose bzw. Leberzirrhose hat die Bedeutung der HEV-Infektion weltweit deutlich zugenommen. In Deutschland liegen bisher nur wenige Daten zur Prävalenz der HEV-Infektion sowie zu möglichen Risikofaktoren vor.

Um retrospektiv die Inzidenz der akuten sowie chronischen HEV-Infektion bei Patienten, die zwischen 2001 und 2006 am Campus Virchow-Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin ein Lebertransplantat erhielten, zu bestimmen, erfolgte in der vorliegenden Arbeit bei 406 Patienten (PCR-Kohorte) zu den Zeitpunkten Monat 6 nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) sowie zu einem 6 Monate späteren Zeitpunkt ein RNA-Screening unter Einsatz einer Real-Time PCR. Um die Seroprävalenz zu bestimmen sowie den Antikörperverlauf nach Lebertransplantation zu beobachten, erfolgte in einer Subkohorte von 150 Patienten (ELISA-Kohorte) die Durchführung eines sequentiellen RNA- und anti-HEV IgG-Screenings zu den Zeitpunkten vor OLT sowie Monat 6, 12 und 36 nach OLT. Weiterhin sollten mit Hilfe eines selbstkonzipierten Fragebogens Risikofaktoren für den Erwerb einer HEV-Infektion identifiziert werden.

Die Inzidenz der HEV-Infektion bei Patienten nach Lebertransplantation war niedrig, jedoch bestand das Risiko eines chronischen Verlaufes: Bei 2 von 406 Patienten (0,5%) konnten zu mindestens einem Untersuchungszeitpunkt HEV-RNA nachgewiesen werden; ein Patient entwickelte einen chronischen Infektionsverlauf. Die in der ELISA-Subkohorte (n=150) ermittelte anti-HEV IgG-Seroprävalenz betrug 21% (n=31). Darüber hinaus zeigte das Antikörperscreening, dass die Mehrzahl der seropositiv getesteten Patienten bereits zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positive Serumproben aufwies (n=28). 20 Patienten wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten seropositiv getestet, während 7 der 28 zum Zeitpunkt vor OLT positiv getesteten Patienten zu den Untersuchungszeitpunkten nach Lebertransplantation im ELISA ein negatives

Testergebnis aufwiesen. Patienten, die durchgehend anti-HEV IgG positiv blieben (n=20), wiesen zum Untersuchungszeitpunkt vor OLT einen signifikant höheren Antikörpertiter auf als Patienten, die ausschließlich zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getestet wurden und danach negativ (n=7). Zusätzlich gab es 3 Patienten (2%), die erstmalig zu einem Verlaufszeitpunkt nach OLT anti-HEV positiv getestet wurden. Die Serumprobe eines Patienten war vor OLT anti-HEV IgG negativ und ab Monat 6 seropositiv. Für diesen Patienten konnte eine akute Infektion nachgewiesen werden. Die übrigen 2 Patienten wurden ausschließlich zu Monat 12 nach OLT anti-HEV IgG positiv getestet, ohne dass zu einem Untersuchungszeitpunkt der Nachweis von HEV-RNA oder anti-HEV IgM gelang. Im Rahmen der Patientenbefragung konnten der häufige Verzehr von Innereien (mehr als 1 Mal pro Monat) sowie häufig wechselnde Sexualpartner (mehr als 10 bis zum Transplantationszeitpunkt) als Risikofaktoren für den Erwerb einer HEV-Infektion herausgestellt werden. Bei einem Patienten, welcher außerhalb der Studienkohorte auf HEV getestet wurde, konnte erstmals gezeigt werden, dass das Virus von einem Spender mit HEV-RNA infizierter Leber, jedoch serologisch okkultem HEV-Status, auf einen Empfänger übertragen werden und sich hieraus eine chronische HEV-Infektion entwickeln kann.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die klinische Bedeutung der HEV-Infektion für Patienten nach Lebertransplantation in einem nichtendemischen Land evaluiert. Die ermittelte HEV-Seroprävalenzrate von 21% verdeutlicht, dass man in Deutschland von einer höheren Exposition gegenüber HEV ausgehen muss als bisher angenommen. Die Rate an Serokonversionen nach Lebertransplantation ist niedrig und das Risiko einer akuten oder chronischen HEV-Infektion für Patienten nach Lebertransplantation gering. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen verdeutlichen zudem die Notwendigkeit der Verbesserung der zur Verfügung stehenden serologischen Testverfahren. Der erstmalig beschriebene Fall einer okkulten Transmission weist auf die Möglichkeit der Viruspersistenz in der Leber bzw. im Gallensystem hin und demonstriert die Möglichkeit der Reaktivierung von HEV bei Patienten mit Immunsuppression.

Literaturverzeichnis

Wissenschaftliche Artikel

- [1] Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP et al. Evidence for A Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted Via the Fecal-Oral Route. *Intervirology*. 1983;20:23-31.
- [2] Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 1991;185:120-131.
- [3] Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Peron JM, Guitard J et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2008;358:811-17.
- [4] Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, Barg-Hock H, Heim A, Kamar N et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2010;16:74-82.
- [5] Haagsma EB, Niesters HG, van den Berg AP, Riezebos-Brilman A, Porte RJ, Vennema H et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2009;15:1225-28.
- [6] Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med*. 2009;361:1025-27.
- [7] Ollier L, Tieulie N, Sanderson F, Heudier P, Giordanengo V, Fuzibet JG et al. Chronic hepatitis after hepatitis E virus infection in a patient with non-Hodgkin lymphoma taking rituximab. *Ann Intern Med*. 2009;150:430-431.
- [8] Kamar N, Mansuy JM, Cointault O, Selves J, Abravanel F, Danjoux M et al. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am J Transplant*. 2008;8:1744-48.
- [9] Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol*. 2008;48:494-503.
- [10] Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol*. 2006;16:5-36.
- [11] Huang FF, Sun ZF, Emerson SU, Purcell RH, Shivaprasad HL, Pierson FW et al. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J Gen Virol*. 2004;85:1609-18.

- [12] Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci.* 2008;33:451-64.
- [13] Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H et al. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:12986-91.
- [14] Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2011;161:47-58.
- [15] Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol.* 2006;80:5919-26.
- [16] Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2007;127:216-28.
- [17] Velazquez O, Stetler HC, Avila C, Ornelas G, Alvarez C, Hadler SC et al. Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA.* 1990;263:3281-85.
- [18] Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol.* 2010;140:256-65.
- [19] Benckert J, Berg T. [Diagnosis and clinical features of infection with hepatitis A and hepatitis E viruses. Transmission through drinking water and foodstuffs]. *Pharm Unserer Zeit.* 2011;40:25-29.
- [20] Pischke S, Heim A, Bremer B, Raupach R, Horn-Wichmann R, Ganzenmueller T et al. Hepatitis E: an emerging infectious disease in Germany? *Z Gastroenterol.* 2011;49:1255-57.
- [21] Khuroo MS. Study of An Epidemic of Non-A, Non-B Hepatitis - Possibility of Another Human Hepatitis-Virus Distinct from Post-Transfusion Non-A, Non-B Type. *American Journal of Medicine.* 1980;68:818-24.
- [22] Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E. *Hepatology.* 2011;54:2218-26.
- [23] Kumar A, Aggarwal R, Naik SR, Saraswat V, Ghoshal UC, Naik S. Hepatitis E virus is responsible for decompensation of chronic liver disease in an endemic region. *Indian J Gastroenterol.* 2004;23:59-62.
- [24] Khuroo MS, Kamili S. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat.* 2003;10:61-69.
- [25] Borgen K, Herremans T, Duizer E, Vennema H, Rutjes S, Bosman A et al. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2. *BMC Infect Dis.* 2008;8:61.
- [26] Mansuy JM, Peron JM, Abravanel F, Poirson H, Dubois M, Miedouge M et al. Hepatitis E in the south west of France in individuals who have never visited an endemic area. *J Med Virol.* 2004;74:419-24.

- [27] Kamar N, Bendall RP, Peron JM, Cintas P, Prudhomme L, Mansuy JM et al. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:173-79.
- [28] Kamar N, Weclawiak H, Guilbeau-Frugier C, Legrand-Abravanel F, Cointault O, Ribes D et al. Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplantation*. 2012;93:617-23.
- [29] Khuroo MS, Kamili S, Dar MY, Moecklii R, Jameel S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet*. 1993;341:1355.
- [30] Myint KS, Endy TP, Shrestha MP, Shrestha SK, Vaughn DW, Innis BL et al. Hepatitis E antibody kinetics in Nepalese patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:938-41.
- [31] Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:895-902.
- [32] Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP, Jr., Thapa GB, Thapa N et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*. 2007;356:895-903.
- [33] Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, Lavayssiere L et al. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation*. 2010;89:353-60.
- [34] Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*. 2011;140:1481-89.
- [35] Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Garrouste C, Dubois M, Mansuy JM et al. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J Infect Dis*. 2010;202:835-44.
- [36] Alric L, Bonnet D, Laurent G, Kamar N, Izopet J. Chronic hepatitis E virus infection: successful virologic response to pegylated interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med*. 2010;153:135-36.
- [37] Kamar N, Abravanel F, Garrouste C, Cardeau-Desangles I, Mansuy JM, Weclawiak H et al. Three-month pegylated interferon-alpha-2a therapy for chronic hepatitis E virus infection in a haemodialysis patient. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:2792-95.
- [38] Haagsma EB, Riezebos-Brilman A, van den Berg AP, Porte RJ, Niesters HG. Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl*. 2010;16:474-77.

- [39] Mallet V, Nicand E, Sultanik P, Chakvetadze C, Tesse S, Thervet E et al. Brief communication: case reports of ribavirin treatment for chronic hepatitis E. *Ann Intern Med.* 2010;153:85-89.
- [40] Alric L, Bonnet D, Beynes-Rauzy O, Izopet J, Kamar N. Definitive clearance of a chronic hepatitis E virus infection with ribavirin treatment. *Am J Gastroenterol.* 2011;106:1562-63.
- [41] Chaillon A, Sirinelli A, De Muret A, Nicand E, d'Alteroche L, Goudeau A. Sustained virologic response with ribavirin in chronic hepatitis E virus infection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30:841-43.
- [42] Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Lhomme S, Esposito L et al. Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis e virus infection. *Gastroenterology.* 2010;139:1612-18.
- [43] Stoszek SK, Engle RE, Abdel-Hamid M, Mikhail N, Abdel-Aziz F, Medhat A et al. Hepatitis E antibody seroconversion without disease in highly endemic rural Egyptian communities. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100:89-94.
- [44] Dalton HR, Thuraiajah PH, Fellows HJ, Hussaini HS, Mitchell J, Bendall R et al. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat.* 2007;14:304-9.
- [45] Kuniholm MH, Purcell RH, McQuillan GM, Engle RE, Wasley A, Nelson KE. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Infect Dis.* 2009;200:48-56.
- [46] Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol.* 2010;82:799-805.
- [47] Ghabrah TM, Tsarev S, Yarbough PO, Emerson SU, Strickland GT, Purcell RH. Comparison of tests for antibody to hepatitis E virus. *J Med Virol.* 1998;55:134-37.
- [48] Mast EE, Alter MJ, Holland PV, Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. *Hepatology.* 1998;27:857-61.
- [49] Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol.* 2002;40:117-22.
- [50] Teo CG. Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:24-32.
- [51] Somani SK, Aggarwal R, Naik SR, Srivastava S, Naik S. A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat.* 2003;10:446-49.

- [52] Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet*. 1995;345:1025-26.
- [53] Kumar RM, Uduman S, Rana S, Kochiyil JK, Usmani A, Thomas L. Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;100:9-15.
- [54] Khuroo MS, Kamili S, Khuroo MS. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat*. 2009;16:519-23.
- [55] Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:9860-9865.
- [56] Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1958-60.
- [57] Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*. 2003;362:371-73.
- [58] Mizuo H, Yazaki Y, Sugawara K, Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T et al. Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol*. 2005;76:341-49.
- [59] Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A et al. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1738-44.
- [60] Bouwknecht M, Frankena K, Rutjes SA, Wellenberg GJ, Roda Husman AM, Van der Poel WH et al. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res*. 2008;39:40.
- [61] Galiana C, Fernandez-Barredo S, Garcia A, Gomez MT, Perez-Gracia MT. Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:1012-15.
- [62] Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A et al. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis*. 2001;184:1594-97.
- [63] Wichmann O, Schimanski S, Koch J, Kohler M, Rothe C, Plentz A et al. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis*. 2008;198:1732-41.
- [64] le Coutre P, Meisel H, Hofmann J, Rocken C, Vuong GL, Neuburger S et al. Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut*. 2009;58:699-702.
- [65] Pavio N, Mansuy JM. Hepatitis E in high-income countries. *Curr Opin Infect Dis*. 2010;23:521-27.

- [66] Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, Pahl S, Ramez B, Kruger DH et al. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol.* 2012;56:500-502.
- [67] Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Saune K, Miedouge M, Ellis V et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:2309-12.
- [68] Mansuy JM, Legrand-Abravanel F, Calot JP, Peron JM, Alric L, Agudo S et al. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in blood donors from South West France. *J Med Virol.* 2008;80:289-93.
- [69] Khudyakov Y, Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011;161:84-92.
- [70] Li F, Torresi J, Locarnini SA, Zhuang H, Zhu W, Guo X et al. Amino-terminal epitopes are exposed when full-length open reading frame 2 of hepatitis E virus is expressed in *Escherichia coli*, but carboxy-terminal epitopes are masked. *J Med Virol.* 1997;52:289-300.
- [71] Khudyakov YE, Lopareva EN, Jue DL, Crews TK, Thyagarajan SP, Fields HA. Antigenic domains of the open reading frame 2-encoded protein of hepatitis E virus. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2863-71.
- [72] Purdy MA, McCaustland KA, Krawczynski K, Spelbring J, Reyes GR, Bradley DW. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild-type hepatitis E virus (HEV). *J Med Virol.* 1993;41:90-94.
- [73] Meng J, Pillot J, Dai X, Fields HA, Khudyakov YE. Neutralization of different geographic strains of the hepatitis E virus with anti-hepatitis E virus-positive serum samples obtained from different sources. *Virology.* 1998;249:316-24.
- [74] Osterman A, Vizoso Pinto MG, Haase R, Nitschko H, Jager S, Sander M et al. Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. *Viol J.* 2012;9:28.
- [75] Adlhoch C, Wolf A, Meisel H, Kaiser M, Ellerbrok H, Pauli G. High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet Microbiol.* 2009;139:270-278.
- [76] Arankalle VA, Lole KS, Deshmukh TM, Chobe LP, Gandhe SS. Evaluation of human (genotype 1) and swine (genotype 4)-ORF2-based ELISAs for anti-HEV IgM and IgG detection in an endemic country and search for type 4 human HEV infections. *J Viral Hepat.* 2007;14:435-45.
- [77] Herremans M, Duizer E, Jusic E, Koopmans MP. Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin a in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:276-80.

- [78] Zhou YH, Purcell RH, Emerson SU. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine*. 2004;22:2578-85.
- [79] Fogeda M, de Ory F, Avellon A, Echevarria JM. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol*. 2009;45:259-61.
- [80] Kim HS, Jeong SH, Jang JH, Myung HJ, Kim JW, Bang SM et al. Coinfection of hepatitis A virus genotype IA and IIIA complicated with autoimmune hemolytic anemia, prolonged cholestasis, and false-positive immunoglobulin M anti-hepatitis E virus: a case report. *Korean J Hepatol*. 2011;17:323-27.
- [81] Jang JH, Jung YM, Kim JS, Lee SH, Kim JW, Hwang SG et al. Coexistence of IgM antihepatitis A virus and IgM antihepatitis E virus in acute viral hepatitis: a prospective, multicentre study in Korea. *J Viral Hepat*. 2011;18:e408-e414.
- [82] Drobeniuc J, Meng J, Reuter G, Greene-Montfort T, Khudyakova N, Dimitrova Z et al. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pangenotypic evaluation of performances. *Clin Infect Dis*. 2010;51:e24-e27.
- [83] Halac U, Beland K, Lapierre P, Patey N, Ward P, Brassard J et al. Chronic hepatitis E infection in children with liver transplantation. *Gut*. 2012;61:597-603.
- [84] Pas SD, de Man RA, Mulders C, Balk AH, van Hal PT, Weimar W et al. Hepatitis E virus infection among solid organ transplant recipients, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:869-72.
- [85] Banks M, Martelli F, Grierson S, Fellows HJ, Stableforth W, Bendall R et al. Hepatitis E virus in retail pig livers. *Vet Rec*. 2010;166:29.
- [86] Bouwknecht M, Lodder-Verschoor F, Van der Poel WH, Rutjes SA, Roda Husman AM. Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in The Netherlands. *J Food Prot*. 2007;70:2889-95.
- [87] Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol*. 2007;88:912-17.
- [88] Di B, I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F et al. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol*. 2008;132:47-55.
- [89] de Deus N, Casas M, Peralta B, Nofrarias M, Pina S, Martin M et al. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol*. 2008;132:19-28.

- [90] Fernandez-Barredo S, Galiana C, Garcia A, Vega S, Gomez MT, Perez-Gracia MT. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18:462-65.
- [91] Fernandez-Barredo S, Galiana C, Garcia A, Gomez-Munoz MT, Vega S, Rodriguez-Iglesias MA et al. Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Can J Vet Res.* 2007;71:236-40.
- [92] Cordoba L, Huang YW, Opriessnig T, Harral KK, Beach NM, Finkelstein CV et al. Three amino acid mutations (F51L, T59A, and S390L) in the capsid protein of the hepatitis E virus collectively contribute to virus attenuation. *J Virol.* 2011;85:5338-49.
- [93] Keane F, Gompels M, Bendall R, Drayton R, Jennings L, Black J et al. Hepatitis E virus coinfection in patients with HIV infection. *HIV Med.* 2012;13:83-88.
- [94] Corey L, Holmes KK. Sexual transmission of hepatitis A in homosexual men: incidence and mechanism. *N Engl J Med.* 1980;302:435-38.
- [95] Dabrowska MM, Nazzal K, Wiercinska-Drapalo A. Hepatitis A and hepatitis A virus/HIV coinfection in men who have sex with men, Warsaw, Poland, September 2008 to September 2009. *Euro Surveill.* 2011;16.
- [96] Mazick A, Howitz M, Rex S, Jensen IP, Weis N, Katzenstein TL et al. Hepatitis A outbreak among MSM linked to casual sex and gay saunas in Copenhagen, Denmark. *Euro Surveill.* 2005;10:111-14.
- [97] Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Lhomme S, Mansuy JM, Muscari F et al. Hepatitis E virus infection without reactivation in solid-organ transplant recipients, France. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:30-37.
- [98] Abravanel F, Mansuy JM, Huynh A, Kamar N, Alric L, Peron JM et al. Low risk of hepatitis E virus reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol.* 2012;54:152-55.
- [99] Kamar N, Izopet J, Rostaing L. No reactivation of hepatitis e virus after kidney retransplantation. *Am J Transplant.* 2012;12:507-8.

Internetquellen

<http://www.cdc.gov/hepatitis/HEV/HEVfaq.htm> (abgerufen am 15.09.2009)

<http://www.mikrogen.de/deutsch/deutschland/produkte/testsysteme/testsystem/h ev-igg.html> (abgerufen am 5.04.2011)

http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/reCfJag5U31Bw/PDF/225zy9Y042TIm6.pdf (abgerufen am 05.06.2011)

Abbildungsverzeichnis

1	Die Genomische Struktur des Hepatitis-E-Virus.	2
2	Geographische Verteilung sowie Übertragungswege der 4 humanpathogenen HEV-Genotypen.	3
3	Endemieregionen für das HEV.	4
4	Der Verlauf virusspezifischer Marker bei der HEV-Infektion.	6
5	Das Prinzip des indirekten Sandwich-ELISA's.	10
6	Darstellung eines HEV-Westernblot-Teststreifens.	11
7	HEV-Seroprävalenzraten in verschiedenen Ländern.	12
8	Ergebnis des anti-HEV IgG-Screenings in der ELISA-Kohorte (n=150) in Form eines Flussdiagramms.	32
9	Ergebnis des anti-HEV IgG-Screenings in der ELISA-Kohorte (n=150) in Form von graphischen Mustern.	32
10	Ergebnisse des anti-HEV IgG-Westernblots in Abhängigkeit vom ELISA-Ergebnis.	35
11	Auftragung der Punktesummen aus dem Westernblot gegen die anti-HEV IgG-Konzentrationen (U/ml) aus dem ELISA.	36
12	Antikörperverteilungsmuster der positiv getesteten HEV-Westernblots	37
13	Der Tacrolimus-Spiegel (ng/ml) in Abhängigkeit von der im HEV-ELISA bestimmten anti-HEV IgG-Konzentration (U/ml).	40
14	Der Verlauf der akuten HEV-Infektion bei Patient 1.	42
15	Der Transaminasenverlauf bei Patient 2.	44
16	Der Transaminasenverlauf bei Patient 3.	45
17	Der Verlauf der chronischen HEV-Infektion bei Patient 4.	52
18	Der Verlauf der chronischen HEV-Infektion bei Patient 5.	55

Tabellenverzeichnis

1	Anzahl gemeldeter HEV-Fälle in Deutschland.	4
2	HEV-Seroprävalenzraten bei Tieren.	14
3	Klinische Patientencharakteristika der Studienteilnehmer.	18
4	Patientencharakteristika der ELISA-Kohorte (n=150).	33
5	Der Verlauf der anti-HEV IgG-Konzentrationen (U/ml) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten bei Patienten der ELISA-Kohorte (n=150)	34
6	Vergleich der Gesamtpunktzahlen der im Westernblot untersuchten Serumproben zum Zeitpunkt vor Lebertransplantation.	38
7	Anti-HEV Seroprävalenz und Odds Ratios für ausgewählte demographisch Variablen in der ELISA-Kohorte (n=150).	47
8	Prävalenz und Odds Ratios von anti-HEV IgG-Antikörpern in Bezug auf ausgewählte Risikofaktoren bei 123 von 150 Patienten der ELISA-Kohorte.	48

Anhang

Tabelle A-1: Bewertung der Bandenintensität eines Westernblot-Streifens bezogen auf die Cutoff-Bande.
Quelle: recomLine HEV, Gebrauchsinformationsheft, Fa. Mikrogen, Version des Jahres 2008, Seite 7

keine Reaktion	-
sehr schwache Intensität (geringer als Cutoff-Bande)	+/-
schwache Intensität (entspricht Cutoff-Bande)	+
starke Intensität (stärker als Cutoff-Bande)	++
Sehr starke Intensität	+++

Tabelle A-2: Punktbewertung der HEV-Antigene für den Westernblot basierend auf der Bandenintensität von Tab. A-1. Es wurden die Farbintensitäten der jeweiligen Banden mit der Cutoff-Kontrolle verglichen. Auf einem HEV-Westernblot-Teststreifen sind verschiedenen Antigene aufgetragen: der N- und C-terminale Teil sowie das Mittelstück des ORF2-Proteins (O2N, O2C, O2M) und das ORF3-Protein (O3).

Quelle: recomLine HEV, Gebrauchsinformationsheft, Fa. Mikrogen, Version des Jahres 2008, Seite 7

Antigen	Punkte für Bandenintensität +	Punkte für Bandenintensität ++ und +++
O2N	1	2
O2C	2	4
O2M	2	4
O3	2	4

Tabelle A-3: Aviditätsindex der zum Zeitpunkt vor orthotoper Lebertransplantation (OLT) anti-HEV IgG positiv (pos.) getesteten Patienten (n=28). Die Avidität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen. Für die Testdurchführung wurden je zwei HEV-Westernblot-Teststreifen mit derselben Serumprobe inkubiert, wobei einem der beiden Teststreifen Aviditätslösung hinzugefügt wurde. Diese lässt niedrig avide Antikörper, die eher im Rahmen einer (post)akuten Infektion gebildet werden, abdiffundieren, während hoch avide Antikörper gebunden bleiben. Man dividierte die beiden Punktzahlen und erhielt den Aviditätsindex für eine Serumprobe. Ein Aviditätsindex von < 0,5 könnte dabei auf einen frühen Infektionszeitpunkt hinweisen und kam in der vorliegenden Testreihe nicht vor. Voneinander getrennt dargestellt sind die Ergebnisse der durchgehend anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) sowie der nur vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7).

Aviditätsindex	vor OLT pos. (n=28)	Gruppe 1 (n=20)	Gruppe 2 (n=7)
1,0	19	13	5
0,9	1	1	
0,8	1	1	
0,7	3	3	
0,5	4	2	2

Tabelle A-4: Durchschnittlicher Aviditätsindex aller zum Zeitpunkt vor orthotoper Lebertransplantation (OLT) anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (n=28), der durchgehend anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und der Patienten, deren Serumproben nur vor OLT anti-HEV IgG positiv waren (Gruppe 2; n=7). Ein Aviditätsindex von < 0,5 könnte dabei auf einen frühen Infektionszeitpunkt hinweisen (zur Berechnung des Aviditätsindexes s.u. Tab. A-3).

Patientengruppe	Aviditätsindex zum Zeitpunkt vor OLT [Punktequotient; Mittelwert ± SD (Spannweite)]
Alle vor OLT seropositiv getesteten Patienten (n=28)	0,88 ± 0,19 (0,5 -1,0)
Gruppe 1 (n=20)	0,88 ± 0,18 (0,5 -1,0)
Gruppe 2 (n=7)	0,86 ± 0,24 (0,5 -1,0)

Anmerkung. OLT, orthotopie Lebertransplantation; SD, standard deviation (*engl.*, Standardabweichung); der Unterschied im Mittelwert zwischen Gruppe 1 (n=20) und Gruppe 2 (n=7) war statistisch nicht signifikant (p=0,97). Der p-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests berechnet.

Tabelle A-5: Darstellung der immunsuppressiven Therapie der anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (n=31) sowie die Differenzierung in durchgehend anti-HEV IgG positiv getestete Patienten (Gruppe 1; n=20) und nur vor orthotoper Lebertransplantation (OLT) anti-HEV IgG positiv getestete Patienten (Gruppe 2; n=7) **a)** zum Zeitpunkt der OLT sowie **b)** zum Zeitpunkt Monat 6 nach OLT. In Klammern sind die zum jeweiligen Medikamentschema zugehörigen Prozentpunkte angegeben.

a)

	im ELISA anti- HEV IgG + (n=31)	Gruppe 1 (n=20)	Gruppe 2 (n=7)
<i>Anzahl der Patienten mit dokumentiertem immunsuppressivem Schema</i>	28 ^a	18 ^a	7
Tacrolimus	1 (3,6)	1 (5,6)	-
Tacrolimus+Kortikosteroid	15 (48,4)	9 (50,0)	4 (57,1)
Tacrolimus+Kortikosteroid+Mycophenolat	4 (14,3)	2 (11,1)	1 (14,3)
Tacrolimus+Kortikosteroid +FK 778	2 (7,1)	1 (5,6)	1 (14,3)
Tacrolimus+Mycophenolat	3 (10,7)	3 (16,7)	-
Mycophenolat+FK 778+Kortikosteroid	1 (3,6)	1 (5,6)	-
Mycophenolat+Sirolimus+Kortikosteroid	1 (3,6)	-	1 (14,3)
Mycophenolat+Cyclosporin+Kortikosteroid	1 (3,6)	1 (5,6)	-

b)

	im ELISA anti- HEV IgG + (n=31)	Gruppe 1 (n=20)	Gruppe 2 (n=7)
<i>Anzahl der Patienten mit dokumentiertem immunsuppressivem Schema</i>	31	20	7
Tacrolimus	11 (35,5)	7 (35,0)	-
Tacrolimus+Kortikosteroid	6 (19,4)	4 (20,0)	4 (57,1)
Tacrolimus+Kortikosteroid +Mycophenolat	4 (13,0)	2 (10,0)	1 (14,3)
Tacrolimus+Mycophenolat	7 (22,6)	5 (25,0)	1 (14,3)
Mycophenolat	1 (3,2)	1 (5,0)	-
Mycophenolat+Sirolimus	1 (3,2)	-	1 (14,3)
Mycophenolat+Kortikosteroid+Cyclosporin	1 (3,2)	1 (5,0)	-

Anmerkungen. ^a Patientenzahlen differieren aufgrund unvollständig dokumentierter immunsuppressiver Medikamentschemata.

Tabelle A-6: Tacrolimus-Spiegel der im ELISA anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (n=31). Vergleich des Medikamentenspiegels (Mittelwert) zwischen den durchgehend anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und den nur vor orthotoper Lebertransplantation (OLT) positiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7). In Klammern ist die Anzahl der Patienten angegeben, bei denen der Tacrolimus-Spiegel bestimmt wurde.

Patientengruppe	Tacrolimus-Spiegel [ng/ml; Mittelwert (n)]		
	Monat 6	Monat 12	Monat 36
Alle im ELISA anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (n=31)	7,72 (28)	5,69 (27)	5,08 (24)
Gruppe 1 (n=20)	7,82 (18)	5,78 (17)	5,11 (15)
Gruppe 2 (n=7)	7,77 (6)	4,75 (6)	4,92 (5)

Anmerkung. der Unterschied im Mittelwert zwischen Gruppe 1 (n=20) und Gruppe 2 (n=7) war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). der p-Wert wurde mit Hilfe des Student's t-Tests berechnet.

Tabelle A-7: Prävalenz und Odds Ratios (OR) von anti-HEV IgG-Antikörpern hinsichtlich eines Tierkontaktes in der ELISA-Kohorte (n=150).

Variable	Patientenanzahl ^a , n (%) ^b	Anti-HEV IgG positiv, ^c % (95% KI)	OR (95% KI)	p-Wert
Haustiere				
Jeglicher Art				
Nein	61 (49,6)	19,7 (9,4-29,9)	1,0	
Ja	62 (50,4)	21,0 (10,6-31,4)	1,08 (0,45-2,61)	1,00
Hund				
Nein	89 (72,4)	20,2 (11,7-28,7)	1,0	
Ja	34 (27,6)	20,6 (6,3-34,9)	1,02 (0,38-2,72)	1,00
Katze				
Nein	91 (74,0)	18,7 (10,5-26,8)	1,0	
Ja	32 (26,0)	25,0 (9,1-40,9)	1,45 (0,56-3,79)	0,45
Beruflicher Tierkontakt				
Nein	110 (89,4)	18,2 (10,9-25,6)	1,0	
Ja	13 (10,6)	38,5 (7,9-69,1)	2,81 (0,83-9,52)	0,14

Anmerkung. KI, Konfidenzintervall; OR, Odds Ratio (*engl.*, Quotenverhältnis).

^a Patientenzahlen variieren aufgrund unvollständiger Teilnahme an der Befragung sowie Tod im Follow-up-Zeitraum.

^b Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Anzahl der Patienten, die die zugehörige Frage beantwortet haben. Insgesamt 123 Patienten aus der ELISA-Kohorte (82%) beantworteten den Fragebogen. 116 von 123 Patienten (94%) beantworteten den Fragebogen vollständig.

^c Die anti-HEV IgG-Seroprävalenz von allen 150 getesteten Patienten lag bei 20,7% (n=31).

Tabelle A-8: Prävalenz und Odds Ratios (OR) von anti-HEV IgG-Antikörpern In Bezug auf Essgewohnheiten in der ELISA-Kohorte (n=150).

Variable	Patienten- anzahl ^a , n (%) ^b	Anti-HEV IgG positiv, ^c % (95% KI)	OR (95% KI)	p- Wert
Konsum von Fleischprodukten, Anzahl / Monat				
0-10	17 (14,2)	17,7 (2,6-37,9)	1,0	
11-20	26 (21,7)	19,2 (3,0-35,5)	1,11 (0,23-5,41)	1,00
>20	77 (64,2)	22,1 (12,6-31,6)	1,32 (0,34-5,14)	1,00
Schweinefleisch und Schinken, Anzahl / Monat				
0-5	41 (33,9)	19,5 (6,9-32,2)	1,0	
6-10	27 (22,3)	7,4 (3,2-18,0)	0,33 (0,06-1,69)	0,29
>10	53 (43,8)	28,3 (15,8-40,8)	1,63 (0,61-4,32)	0,35
Innereien				
Nein	33 (27,5)	18,1 (4,3-32,1)	1,0	
Ja	87 (72,5)	21,8 (13,0-30,7)	1,26 (0,45-3,48)	0,80
Innereien, Anzahl / Monat				
0	33 (27,5)	18,2 (4,3-32,1)	1,0	
<1	43 (35,8)	16,3 (4,8-27,8)	0,86 (0,26-2,90)	1,00
1	30 (25,0)	16,7 (2,5-30,8)	0,90 (0,24-3,32)	1,00
>1	14 (11,7)	50,0 (20,0-80,0)	4,50 (1,14-17,73)	0,04
Leber, Anzahl / Monat				
0	37 (30,8)	24,3 (9,8-38,8)	1,0	
1-10	46 (38,3)	17,4 (6,0-28,8)	0,66 (0,23-1,91)	0,59
>10	37 (30,8)	21,6 (7,7-31,5)	0,89 (0,29-2,54)	1,00
Wild				
Nein	78 (63,9)	19,2 (10,3-28,2)	1,0	
Ja	44 (36,1)	22,7 (9,8-35,6)	1,23 (3,05-0,50)	0,65
Wild, Anzahl / Jahr				
0	78 (63,9)	19,2 (10,3-28,2)	1,0	
1-10	38 (31,1)	21,1 (7,5-34,6)	1,12 (0,43-2,93)	0,81
>10	6 (4,9)	33,3 (20,9-87,5)	2,10 (0,35-12,56)	0,60
Wildschwein				
Nein	92 (75,4)	20,7 (12,2-29,1)	1,0	
Ja	30 (24,6)	20,0 (4,8-35,2)	0,96 (0,34-2,68)	1,00
Hirsch / Reh				
Nein	91 (74,6)	20,9 (12,4-29,4)	1,0	
Ja	31 (25,4)	19,4 (4,6-34,1)	0,91 (0,33-2,53)	1,00

Anmerkung. KI, Konfidenzintervall; OR, Odds Ratio (*engl.*, Quotenverhältnis).

^a Patientenzahlen variieren aufgrund unvollständiger Teilnahme an der Befragung sowie Tod im Follow-up-Zeitraum.

^b Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Anzahl der Patienten, die die zugehörige Frage beantwortet haben. Insgesamt 123 Patienten aus der ELISA-Kohorte (82%) beantworteten den Fragebogen. 116 von 123 Patienten (94%) beantworteten den Fragebogen vollständig.

^c Die anti-HEV IgG-Seroprävalenz von allen 150 getesteten Patienten lag bei 20,7% (n=31).

Tabelle A-9: Prävalenz und Odds Ratios (OR) von anti-HEV IgG hinsichtlich stattgehabter viraler Hepatitiden in der ELISA-Kohorte (n=150).

Variable	Patientenanzahl ^a , n (%) ^b	Anti-HEV IgG positiv, ^c % (95% KI)	OR (95% KI)	p-Wert
HCV-Antikörper				
Nein	117 (79,1)	22,2 (14,6-29,9)	1,0	
Ja	31 (20,9)	12,9 (0,4-25,4)	0,52 (0,17-1,62)	0,32
HBV core Antikörper				
Nein	106 (72,1)	19,8 (12,1-27,5)	1,0	
Ja	41 (27,9)	22,0 (8,7-35,2)	1,14 (2,75-0,47)	0,82
HAV-Antikörper				
Nein	39 (27,3)	12,8 (1,8-23,8)	1,0	
Ja	104 (72,7)	22,1 (14,0-30,2)	1,93 (0,68-5,49)	0,25

Anmerkung. HAV, Hepatitis-A-Virus; HBV, Hepatitis-B-Virus; HCV, Hepatitis-C-Virus; KI, Konfidenzintervall; OR, Odds Ratio (*engl.*, Quotenverhältnis).

^a Patientenzahlen variieren aufgrund fehlender Daten zu den jeweiligen Laborwerten sowie Tod im Follow-up-Zeitraum.

^b Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Anzahl der Patienten, für die der Antikörperstatus vor OLT dokumentiert war.

^c Die anti-HEV IgG-Seroprävalenz von allen 150 getesteten Patienten lag bei 20,7% (n=31).

Tabelle A-10: Histologisches Grading der im ELISA anti-HEV IgG positiv (pos.) getesteten Patienten (n=31) zu den Zeitpunkten Monat 12 und Monat 36 nach orthotoper Lebertransplantation (OLT). Bestimmt wurde der Grad der Entzündung, der Grad der Fibrose (beide nach Desmet/Scheuer) sowie der prozentuale Anteil der Parenchymverfettung. Angegeben sind die zu den verschiedenen Stadien gehörenden Patientenzahlen. Getrennte Darstellung für die durchgehend seropositiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und die nur zum Zeitpunkt vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7).

	Monat 12			Monat 36		
	ELISA pos.(n=31)	Gruppe 1 (n=20)	Gruppe 2 (n=7)	ELISA pos.(n=31)	Gruppe 1 (n=20)	Gruppe 2 (n=7)
Entzündung						
keine Entzündung	1	1	-	5	2	1
Stadium 1	19	12	4	17	11	4
Stadium 2	-	-	-	1	1	-
Stadium 3	-	-	-	1	1	-
Stadium 4	-	-	-	-	-	-
Fibrose						
keine Fibrose	1	-	-	4	1	2
Stadium 1	13	8	2	9	7	1
Stadium 2	8	6	2	11	6	3
Stadium 3	-	-	-	1	1	-
Stadium 4	-	-	-	-	-	-
Parenchymverfettung						
<5%	11	6	2	8	6	1
5-33%	8	6	2	13	7	3
33-66%	-	-	-	2	1	1
>66%	-	-	-	1	-	1

Anmerkung. Patientenzahlen variieren aufgrund einer nicht bei allen Patienten durchgeführten Biopsie sowie unvollständiger Beschreibung der hier dargestellten Punkte im pathologischen Befundbericht. Einteilung der Entzündung nach Desmet-Scheuer: Stadium 1, nur portale Entzündung; Stadium 2, geringe Interface-Hepatitis; Stadium 3, moderate Interface-Hepatitis; Stadium 4, ausgedehnte Interface-Hepatitis. Einteilung der Fibrose nach Desmet-Scheuer: Stadium 1, nur portale Fibrose; Stadium 2, periportale Fibrose mit porto-portalen Septen bei erhaltener Architektur; Stadium 3, Fibrose mit zerstörter Architektur ohne offensichtliche Zirrhose; Stadium 4, wahrscheinliche oder definitive Zirrhose.

Tabelle A-11: Vergleich der Mittelwerte aus dem in Tabelle A-10 dargestellten histologischen Grading der im ELISA anti-HEV IgG positiv (pos.) getesteten Patienten (n=31) zu den Zeitpunkten Monat 12 und Monat 36 nach orthotoper Lebertransplantation (OLT). Jedem Stadium wurde die äquivalente Punktzahl verteilt (0 Punkte für „keine Entzündung bzw. Fibrose“ und 1, 2, 3 und 4 Punkte für die Stadien 1 bis 4; s. Tab. A-10) sowie jedem Stadium der Parenchymverfettung 1 Punkt (1 Punkt für eine Parenchymverfettung <5% und 4 für >66%, s. Tab. A-10). Die Mittelwerte wurden für die durchgehend seropositiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und die nur vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7) auf statistische Signifikanz überprüft (p-Wert).

	Monat 12				Monat 36			
	ELISA pos. (n=31)	Gruppe 1 (n=20)	Gruppe 2 (n=7)	p-Wert	ELISA pos. (n=31)	Gruppe 1 (n=20)	Gruppe 2 (n=7)	p-Wert
Entzündung [Punkte; Mittelwert ± SD (Spannweite)]	0,95 ± 0,22 (0-1)	0,92 ± 0,28 (0-1)	1,00 ± 0,00 (1-1)	0,58	0,92 ± 0,65 (0-3)	1,07 ± 0,70 (0-3)	0,80 ± 0,45 (0-1)	0,46
Fibrose [Punkte; Mittelwert ± SD (Spannweite)]	1,32 ± 0,57 (0-2)	1,43 ± 0,51 (1-2)	1,50 ± 0,58 (1-2)	0,80	1,36 ± 0,81 (0-3)	1,47 ± 0,74 (0-3)	1,17 ± 0,98 (0-2)	0,59
Parenchymverfettung [Punkte; Mittelwert ± SD (Spannweite)]	1,42 ± 0,51 (1-2)	1,50 ± 0,52 (1-2)	1,50 ± 0,58 (1-2)	1,00	1,83 ± 0,76 (1-4)	1,64 ± 0,63 (1-3)	2,33 ± 1,03 (1-4)	0,12

Anmerkung. SD, standard deviation (*engl.*, Standardabweichung); der p-Wert wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests berechnet.

Tabelle A-12.: Labordaten der im ELISA anti-HEV IgG positiv (pos.) getesteten Patienten (n=31) zu den Untersuchungszeitpunkten Monat 6, 12 und 36 nach orthotoper Lebertransplantation (OLT). Die Mittelwerte wurden für die durchgehend seropositiv getesteten Patienten (Gruppe 1; n=20) und die nur vor OLT anti-HEV IgG positiv getesteten Patienten (Gruppe 2; n=7) auf statistische Signifikanz überprüft.

	ELISA-pos. (n=31)	Gruppe 1 (n=20)	Gruppe 2 (n=7)	p-Wert
Gesamt-Bilirubin [mg/dl; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	0,74	0,81	0,61	>0,05
Monat 12	0,68	0,73	0,61	>0,05
Monat 36	0,73	0,76	0,80	>0,05
AST [OGW; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	0,73	0,63	0,60	>0,05
Monat 12	0,64	0,63	0,55	>0,05
Monat 36	0,64	0,60	0,72	>0,05
ALT [OGW; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	0,94	0,60	0,64	>0,05
Monat 12	0,62	0,58	0,51	>0,05
Monat 36	0,66	0,60	0,80	>0,05
AP [U/l; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	150,19	135,90	190,57	>0,05
Monat 12	126,48	122,05	130,57	>0,05
Monat 36	85,41	80,15	99,14	>0,05
γ-GT [U/l; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	60,55	48,55	58,86	>0,05
Monat 12	65,81	64,60	41,57	>0,05
Monat 36	51,87	43,45	64,86	>0,05
Albumin [g/dl; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	4,25	4,34	4,20	>0,05
Monat 12	4,41	4,43	4,31	>0,05
Monat 36	4,45	4,46	4,47	>0,05
Thromboplastinzeit [%; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	93,65	92,50	93,57	>0,05
Monat 12	94,26	91,70	98,71	>0,05
Monat 36	95,26	93,65	97,14	>0,05
CRP [mg/dl; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	0,50	0,59	0,31	>0,05
Monat 12	0,73	0,90	0,50	>0,05
Monat 36	0,58	0,44	1,17	>0,05
Leukozytenzahl [/nl; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	5,36	4,97	5,87	>0,05
Monat 12	5,31	5,27	5,40	>0,05
Monat 36	6,11	5,86	6,66	>0,05
Thrombozytenzahl [/nl; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	171,06	168,30	165,29	>0,05
Monat 12	170,29	166,35	175,14	>0,05
Monat 36	184,39	178,90	183,29	>0,05
Hämoglobin [g/dl; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	12,08	12,34	11,66	>0,05
Monat 12	12,80	12,99	12,44	>0,05
Monat 36	13,64	13,64	13,80	>0,05
Ferritin [µg/l; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	413,79	397,74	321,00	>0,05
Monat 12	335,32	315,30	241,86	>0,05
Monat 36	383,35	392,72	274,71	>0,05
Kreatinin [mg/dl; MW ± SD (Spannweite)]				
Monat 6	1,33	1,36	1,28	>0,05
Monat 12	1,30	1,32	1,35	>0,05
Monat 36	1,32	1,33	1,36	>0,05

Anmerkung. ALT, Alanin-Aminotransferase; AP, Alkalische Phosphatase; AST, Aspartat-Aminotransferase; CRP, C-reaktives Protein; γ-GT, γ-Glutamyltransferase; MW, Mittelwert; SD, standard deviation (*engl.*, Standardabweichung); der p-Wert wurde mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben berechnet.

**Fragebogen zum Risikoprofil einer HEV-Infektion bei Patienten
nach Lebertransplantation**

Demographische Daten

1. In welchem Land sind Sie geboren?

Land:

2. Falls Sie nicht in Deutschland geboren sind, seit wann leben Sie in Deutschland?

Jahr:

3. In welchem Ort haben Sie zum Zeitpunkt der Transplantation gelebt?

Ort:

Einwohneranzahl: <5000 5000-20.000 20.000-100.000 >100.000

Bundesland:

4. Haben Sie vor der Transplantation in weiteren Bundesländern gelebt?

ja nein

5. Wenn ja, in welchen und für wie lange?

Ort: Bundesland: Dauer:

Ort: Bundesland: Dauer:

Ort: Bundesland: Dauer:

Weitere:

Tierkontakt

6. Hatten Sie jemals vor der Transplantation regelmäßigen beruflichen Kontakt zu Tieren?

ja nein

16. Haben Sie vor der Transplantation regelmäßig anderes Wild gegessen (Hirsch, Reh, Kaninchen...)?

ja nein

17. Wenn ja, welches und wie oft im Monat bzw. im Jahr?

Hirsch Häufigkeit:

Reh Häufigkeit:

Kaninchen Häufigkeit:

Sonstiges Häufigkeit:

Sonstige Risikofaktoren

18. Hatten Sie jemals vor der Transplantation beruflichen Kontakt zu Abwässern?

ja nein

19. Haben Sie vor der Transplantation regelmäßig im Wald gearbeitet (Holz hacken, andere forstwirtschaftliche Tätigkeiten, Pilze sammeln...)

ja nein

20. Wenn ja, welche Tätigkeit haben Sie genau ausgeübt und wie oft ungefähr im Jahr?

Arbeitsform: Frequenz/Jahr:

21. Haben Sie vor der Transplantation Drogen konsumiert?

ja nein

22. Wenn ja, in welcher Form wurde die Droge zugeführt?

oral (geraucht oder z.B. in Form von Tabletten)

intravenös (über den Blutweg)

23. Haben Sie jemals vor der Transplantation Bluttransfusionen erhalten?

ja nein

24. Haben Sie vor der Transplantation jemals außerhalb von Deutschland Urlaub gemacht?

ja nein

25. Wenn ja, auf welchen Kontinenten und in welchen Ländern?

Europa Länder:

Afrika Länder:

Amerika Länder:

Asien Länder:

Australien

26. Wieviele Sexualpartner hatten Sie insgesamt bis zum Zeitpunkt der Transplantation:

1-10 >10

27. Hatten Sie jemals gleichgeschlechtlichen Geschlechtsverkehr?

ja nein

Ort, Datum, Unterschrift

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bahram Ramez, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Inzidenz, Seroprävalenz, Antikörperverlauf und klinische Epidemiologie der Hepatitis-E-Virus-Infektion bei Patienten nach Lebertransplantation“ 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 (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und 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. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Bahram Ramez hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: B. Schlosser, A. Stein, R. Neuhaus, S. Pahl, B. Ramez, D.H. Krüger, T. Berg, J. Hofmann, Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient, Journal of Hepatology, Juli 2011

Beitrag im Einzelnen: Materialsuche und –beschaffung, Versuchsdurchführung, Recherche klinischer Patientendaten

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

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

Publikationen

“Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient”

B. Schlosser, A. Stein, R. Neuhaus, S. Pahl, B. Ramez, D.H. Krüger, T. Berg, J. Hofmann

July 2011, Journal of Hepatology (Impact factor: 9.3)

“Prevalence of Hepatitis E virus infection in patients before and after liver transplantation: A single center long-term follow-up study”

Beate Schlosser, Bahram Ramez, Ruth Neuhaus, Angela Stein, Daniel Seehofer, Gerhard Hunold, Peter Neuhaus Jörg Hofmann, Thomas Berg

The Liver Meeting® 2010, American Association for the Study of Liver Diseases

Danksagung

Ich bedanke mich zunächst ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Berg für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit des klinisch-wissenschaftlichen Arbeitens in seinem Team. Seine Hilfsbereitschaft, kritische Durchsicht und wissenschaftlichen Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. Jörg Hofmann für den freundlichen Umgang, die hilfreichen Ratschläge und die stete Ansprechbarkeit während der Versuchsdurchführungen in der Virologie am Campus Charité Mitte.

In besonderem Maße danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. Beate Schlosser. Vielen Dank für das Korrekturlesen und die zahlreichen Ratschläge, für die permanente Ansprechbarkeit und die freundliche sowie vorbildliche Betreuung zu allen Arbeitsphasen.

Bei Frau Barbara Malik, Angelika Krössin und Hannelore Willeken aus dem Labor für molekulare Hepatitisvirusdiagnostik am Campus Virchow-Klinikum bedanke ich mich herzlich für die Hilfestellungen und den freundschaftlichen Umgang während der Phase der Patientenrekrutierung und des Heraussuchens der Serumproben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Sigrid Kersten und allen Labormitarbeitern der Virologie am Campus Charité Mitte für deren Unterstützung, Hilfe und Geduld während der Versuchsdurchführungen bedanken.

Einen liebevollen Dank möchte ich meiner Freundin aussprechen. Vielen Dank für das orthographische Korrekturlesen, das liebevolle Verständnis und die aufgebrachte Geduld trotz eigener Arbeitsbelastung während des Erstellens der Dissertationsschrift.

Meinen Eltern danke ich aufrichtig für ihre fortwährende Unterstützung und Liebe. Sie bildeten stets einen sicheren emotionalen Rückhalt und ermöglichten mir das Medizinstudium sowie die Arbeit an der vorliegenden Promotion. Ihnen ist die vorliegende Arbeit gewidmet.

Ein besonderer Dank gilt abschließend allen Patienten nach Lebertransplantation am Campus Virchow-Klinikum, deren Serumproben ich untersuchen durfte, sowie allen Studienteilnehmern, die bereitwillig und im Sinne des wissenschaftlichen Fortschrittes an der Patientenbefragung teilgenommen haben.