

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
LEITER: PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Langzeitverlauf Hepatitis-E-spezifischer Antikörper

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christina Susanne Rauh

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
LEITER: PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Langzeitverlauf Hepatitis-E-spezifischer Antikörper

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christina Susanne Rauh

2017

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Thorsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

PD Dr. Jürgen Wenzel

2. Berichterstatter:

PD Dr. Jens Werner

Tag der mündlichen Prüfung:

18.04.2018

Diese Dissertationsschrift beruht gemäß § 6, Absatz 7 der Promotionsordnungen für die Medizinische Fakultät und die Naturwissenschaftliche Fakultät III (medizinische Fächer) der Universität Regensburg auf folgender Publikation:

Schemmerer, M., Rauh, C., Jilg, W. and Wenzel, J. J. (2017), Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults. J Viral Hepat, 24: 75–79. doi:10.1111/jvh.1262

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Zusammenfassung	III
1 Thematische Einordnung	1
1.1 Das Hepatitis-E-Virus.....	1
1.2 Epidemiologie und Übertragungswege der HEV-Infektion	3
1.3 Das Krankheitsbild der Hepatitis E.....	3
1.4 Behandlung und Prophylaxe einer HEV-Infektion	5
1.5 Fragestellung der Arbeit.....	6
2 Methodik	7
2.1 Zusammenstellung der Serumproben.....	7
2.2 Serologische Testung	7
2.3 IgG-Avidität	9
2.4 Definition einer HEV-Reinfektion.....	9
3 Ergebnisse	10
3.1 Probenkollektiv.....	10
3.2 Endpunkt-Analyse.....	10
3.3 Konzentrationsdynamik.....	11
3.4 Gesamttrend	12
4 Diskussion.....	13
5 Ausblick.....	15
6 Literaturverzeichnis.....	16
7 Abbildungsverzeichnis	21
Originalpublikation	22
Erklärung gemäß §6 Abschnitt 5 (2).....	27
Danksagung	28
Eigene Veröffentlichungen.....	29

Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HEV	Hepatitis-E-Virus
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgM	Immunglobulin Klasse M
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control, UK
Kap.	Kapitel
RKI	Robert Koch-Institut, Berlin
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WU	WHO Units (WHO Einheiten)
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Für das Jahr 2016 verzeichnet das Robert-Koch-Institut 1991 gemeldete Hepatitis-E-Fälle in Deutschland (1). Dabei spiegeln die offiziellen Meldezahlen nur einen kleinen Teil der tatsächlichen HEV-Infektionen wider: Die Daten zur Anti-HEV-IgG-Prävalenz für Deutschland und andere westliche Industrienationen sind erstaunlich hoch. Was lange Zeit ausschließlich als exotische Reiseinfektion galt, muss heute als eine endemische Zoonose betrachtet werden. Die Diskrepanz zwischen niedrigen Meldezahlen und hoher Antikörperprävalenz ergibt sich aus dem meist asymptomatischen Verlauf der Infektion. Nur ein sehr kleiner Anteil der Infizierten hierzulande entwickelt die typischen Symptome einer manifesten Hepatitis. Für immunsupprimierte Patienten, insbesondere nach Lebertransplantation, kann eine Hepatitis-E-Erkrankung jedoch lebensgefährlich sein. In den letzten Jahren kommt der Infektion mit HEV daher eine wachsende Aufmerksamkeit zu und die fünfte der klassischen Virushepatitiden sollte stets in differenzialdiagnostische Überlegungen einbezogen werden. Über die Immunantwort ist jedoch nur wenig bekannt. Wie bei allen Virusinfekten erfolgt sie wohl über die Bildung kurzlebiger IgM- und langlebiger IgG-Antikörper. Letztere können nach einer durchgemachten Infektion jahrelang persistieren, ob eine lebenslange Immunität besteht, ist jedoch noch unklar. Es fehlt an Daten zum individuellen und allgemeinen Langzeitverlauf des Antikörperspiegels. Kommt es im Verlauf zur negativen Serokonversion? Ist eine Reinfektion möglich? Genau diesen, bislang wenig geklärten Fragen widmet sich der vorliegende Artikel. Ziel der Arbeit war es, langfristige Konzentrationsveränderungen der Anti-HEV-IgG-Antikörper im Serum mittels ELISA näher zu untersuchen. Insgesamt wurden dazu 199 Serumproben, die über einen Zeitraum von 18 Jahren 45 Probanden entnommen worden waren, untersucht. Dabei standen im Median drei Proben pro Proband zur Verfügung. Von einigen Probanden konnten aber auch fünf oder mehr Seren analysiert werden. So konnte erstmals ein sehr detaillierter Einblick in den langfristigen individuellen Anti-HEV-Konzentrationsverlauf gewonnen werden. Es erfolgte nicht nur eine quantitative Bestimmung von Anti-HEV-IgG, sondern es wurde zudem die Avidität sowie das Vorliegen von Anti-HEV-IgM untersucht. Es zeigte sich ein vielschichtiges Ergebnis. Zusammenfassend konnte ein signifikanter Abfall der Antikörperkonzentration nach fünf Jahren beobachtet werden. Negative Serokonversion konnte in einem Fall nachgewiesen werden. Bei vier Probanden

Zusammenfassung

ergaben sich Hinweise auf eine einfache und teilweise sogar multiple Reinfektion, trotz zuvor bereits vorhandener hoch avider Anti-HEV Antikörper.

1 Thematische Einordnung

Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) infizieren sich pro Jahr ca. 20 Millionen Menschen mit dem Hepatitis-E-Virus. Nur etwa drei Millionen davon erkranken an einer akuten Hepatitis. Diese ist meist eine selbstlimitierende Erkrankung, sie kann jedoch auch fulminant verlaufen. Die WHO geht von ca. 56.600 Hepatitis-E-assoziierten Todesfällen jährlich aus (2).

Die Entdeckung des Hepatitis-E-Virus liegt etwa 30 Jahre zurück. Mikhail S. Balayan, ein Virologe aus der ehemaligen Sowjetunion, infizierte sich im Jahr 1983 selbst mit dem damals noch unbekanntem Virus: Er nahm Stuhlsuspension von mehreren an einer rätselhaften „neuen“ Hepatitis erkrankten Patienten in Zentralasien zu sich. In seinem Labor in Moskau isolierte er das Virus, welches er nun selbst ausschied, analysierte es mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und beschrieb somit einen neuen fäkal-oral übertragbaren Hepatitis-Erreger (3).

1.1 Das Hepatitis-E-Virus

Das Hepatitis-E-Virus wurde lange Zeit als ein „Non-A-Non-B-Hepatitis-Virus“ bezeichnet und der Familie der Caliciviren zugerechnet, deren Mitgliedern es aufgrund seiner elektronenmikroskopischen Struktur ähnlich war. In weiteren Untersuchungen stellte man jedoch wesentliche Unterschiede zu den Caliciviren fest, vor allem den Replikationszyklus und die Genomstruktur betreffend. So wurde eigens für die Hepatitis-E-Viren eine neue Familie eingeführt, die Familie der Hepeviridae. Bislang ist das Hepatitis-E-Virus das einzige Mitglied dieser Virusfamilie und gehört darin zur Gattung Hepevirus (4).

Das Hepatitis-E-Virus ist ein hüllmembranloses Virus mit einem ikosaedrischen Capsid, welches die virale RNA umschließt. Die Viruspartikel haben eine Größe von 32 bis 34 nm. Das Capsid besteht aus 180 Einheiten eines 76kD Proteins, dem sog. Capsidprotein. Außerdem enthalten die Viruspartikel eine variable Menge eines kleineren, löslichen Proteins mit einem Molekulargewicht von 14,5kD. Der Ursprung dieses kleineren Proteins ist ungeklärt, eventuell handelt es sich um ein Spaltprodukt des Capsidproteins (4).

Das Hepatitis-E-Virus gehört zur Gruppe der einzelsträngigen RNA-Viren. Die RNA liegt dabei in Plusstrang-Orientierung vor. Die Länge des Genoms ist abhängig vom Genotyp und liegt zwischen 7194 und 7232 Basen. Am 5'-Ende findet sich eine Cap-

Thematische Einordnung

Struktur, am 3'-Ende ist das RNA-Genom polyadenyliert. An den beiden Enden befinden sich kurze Sequenzfolgen, die höchstwahrscheinlich nicht codierend sind. Die viralen Proteine sind in drei offenen Leserahmen (ORF) codiert, die sich teilweise überlappen. Der erste offene Leserahmen (ORF1), welcher sich an das 5'-Ende anschließt, enthält die genetische Information für ein Vorläuferprotein, das im weiteren Verlauf proteolytisch in verschiedene Nichtstrukturproteine gespalten wird. Das virale Capsidprotein wird vom zweiten offenen Leserahmen (ORF2) codiert. Der dritte offene Leserahmen (ORF3) liefert die Information für die Synthese eines kleinen Proteins, von dem man annimmt, dass es für die Infektiosität des Hepatitis-E-Virus eine wichtige Rolle spielt (4).

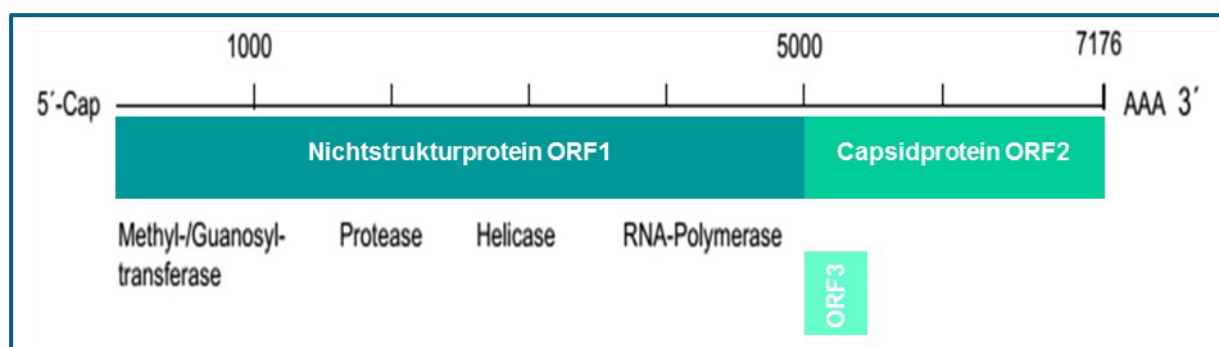


Abbildung 1: Genomorganisation des Hepatitis-E-Virus (modifiziert nach(4))

Bisher sind vier Genotypen des Hepatitis-E-Virus bekannt, die jedoch alle einen einzigen Serotyp repräsentieren. Die Genotypen unterscheiden sich sowohl in ihrer geographischen Verbreitung, als auch in den Spezies, die infiziert werden. Genotyp 1 wurde bisher nur im Menschen gefunden und zirkuliert vor allem in den tropischen und subtropischen Ländern Asiens und Afrikas. Auch Genotyp 2 ist auf den Menschen beschränkt, sein Hauptverbreitungsgebiet ist Mexiko sowie West- und Südafrika. Die beiden Genotypen 3 und 4 infizieren vor allem Schweine, aber auch andere Säugetiere und den Menschen, letzteren wohl im Rahmen einer klassischen Zoonose. Infektionen mit Genotyp 3 werden weltweit gefunden. Genotyp 4 spielt vor allem in Ost- und Südostasien eine Rolle als Erreger bei sporadischen Hepatitisfällen, ebenfalls mit Reservoir im Schwein (siehe 1.2) (5,6).

Der Pathomechanismus der Hepatitis-E-Virus-Infektion ist noch weitgehend ungeklärt: Nach der Übertragung des Virus über den fäkal-oralen Weg gelangt es wahrscheinlich über die Pfortader in die Leber. Die Replikation erfolgt im Zytoplasma der Hepatozyten, von dort aus gelangt das Virus in die Galle und folglich auch in den Stuhl (7). Der genaue Mechanismus hierbei ist noch wenig verstanden. Histologisch

imponiert die akute HEV-Infektion mit ballonierten Hepatozyten, azidophilen Einschlusskörperchen und fokaler Nekrose. Die Portalfelder und Leberläppchen sind entzündlich infiltriert, wobei vor allem Monozyten und aktivierte Kupferzellen vorherrschen. Es wird davon ausgegangen, dass die Leberzellschädigung mit Transaminasenerhöhung weniger durch einen zytopathischen Effekt des Virus selbst als vielmehr durch die eingeleitete Immunantwort verursacht wird (8).

1.2 Epidemiologie und Übertragungswege der HEV-Infektion

Für Deutschland und Europa spielen vor allem die Genotypen 3 und 4 eine wichtige Rolle. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt wahrscheinlich fäkal-oral im Sinne einer klassischen Zoonose. Als Infektionsweg ist dabei in den meisten Fällen der Verzehr von ungenügend gekochtem Fleisch, Innereien oder Meeresfrüchten anzunehmen. Vor allem Schweine- und Wildprodukte bergen dabei ein hohes Risiko (9). Diese These wird von einigen Untersuchungen gestützt, die zeigen konnten, dass virusspezifische Nukleinsäuresequenzen in der tierischen Infektionsquelle und im infizierten Patienten nahezu identisch waren (10,11). Solche Infektionen, vor allem mit dem Genotyp 3, sind in Europa wohl häufiger als angenommen. Untersuchungen aus den letzten Jahren zur Prävalenz von Anti-HEV-IgG zeigten überraschend hohe Zahlen für einige europäische Staaten (12–14). Die meisten dieser Infektionen verlaufen jedoch asymptomatisch und selbstlimitierend und werden daher nur selten im akuten Stadium diagnostiziert. Steigende Meldezahlen in den letzten Jahren (15) sind am ehesten auf eine gesteigerte Aufmerksamkeit bezüglich dieses Krankheitsbildes zurückzuführen (16). Eine Übertragung des Virus ist auch parenteral durch kontaminierte Blutprodukte möglich. Hierbei kann es vor allem bei immunsupprimierten Empfängern zu persistierenden HEV-Infektionen kommen (17). Ob ein Screening von Blutprodukten auf Hepatitis E notwendig ist, ist derzeit noch Gegenstand der Diskussion (18).

Infektionen mit den Genotypen 1 und 2 spielen in Deutschland nur als importierte Reiseinfektionen eine Rolle.

1.3 Das Krankheitsbild der Hepatitis E

Wie bereits oben erwähnt, geht die WHO von ca. 20 Millionen HEV-Infektionen pro Jahr, dabei aber nur von 3 Millionen akuten Hepatitis-E-Fällen aus (2). Die Mehrzahl der Fälle, vor allem bei immunkompetenten Individuen, verläuft demnach

asymptomatisch. Tritt die Erkrankung tatsächlich klinisch in Erscheinung, zeigt sich die im Folgenden beschriebene Symptomatik: Nach einer Inkubationszeit von zwei bis neun Wochen (19) treten bei der typischen, unkomplizierten, akuten Hepatitis-E-Erkrankung die klassischen Symptome einer Virushepatitis auf. Auf ein Prodromalstadium mit unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, allgemeinem Krankheitsgefühl, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Bauch- und Gelenkschmerzen sowie Fieber folgen Transaminasenerhöhung und Gelbsucht (20). Bei ansonsten gesunden, immunkompetenten Personen ist die Erkrankung in den meisten Fällen selbstlimitierend, die Symptome klingen nach spätestens sechs Wochen ab und die Hepatitis heilt folgenlos aus. Anders sieht dies hingegen bei chronisch kranken oder immunsupprimierten Patienten aus. Hier wurden in den letzten Jahren einige Fälle berichtet, in denen schwerwiegende Komplikationen oder eine Chronifizierung auftraten (21–23). Hepatitis E ist daher als wichtige Differentialdiagnose einer unklaren Leberwerterhöhung, vor allem bei immunkompromittierten Patienten, zu bedenken.

In Asien und Afrika, wo die Infektion mit dem Genotyp 1 und 2 endemisch ist, ist eine weitere Risikogruppe besonders zu erwähnen: Bei Schwangeren werden hier vermehrt fulminante Verläufe mit Leberversagen, bis hin zum Tod von Mutter oder ungeborenem Kind beschrieben (24,25). In Europa gibt es nur wenige Einzelfallberichte von HEV-Infektionen in der Schwangerschaft. Dabei scheint die Infektion mit Genotyp 3 mit keinem erhöhten Risiko für die Schwangere einherzugehen (26,27).

Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die möglichen extrahepatischen Symptome einer HEV Infektion (28). Vor allem über neurologische Manifestationen im Zuge einer Infektion mit Genotyp 3 wurden in den letzten Jahren einige Fallberichte veröffentlicht. Berichtet wurde von assoziierten peripheren Neuralgien, Meningitiden oder dem Auftreten eines Guillan-Barré-Syndroms (29,30).

Die Immunantwort beginnt mit kurzlebigen Antikörpern der Klasse IgM. Ihre Konzentration scheint bereits vor dem Auftreten der klinischen Symptome ihren Höhepunkt zu erreichen. Der Titer bleibt hoch für weitere circa acht Wochen, dann fällt der Spiegel und nach durchschnittlich 32 Wochen sind die IgM-Antikörper bei den meisten Patienten nicht mehr nachweisbar (31). Anders sieht es bei den langlebigen Antikörpern der Klasse IgG aus. Sie beginnen zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation erst langsam anzusteigen, den Höhepunkt erreichen sie

nach circa vier Wochen (31). Mindestens ein Jahr lang sind sie dann in hoher Konzentration nachweisbar (31). Was anschließend passiert, ist weitgehend unbekannt. Vor allem auf diesen Punkt wird im Folgenden noch näher eingegangen werden. Die Viruslast im Blut ist während der Inkubationszeit am höchsten, schon etwa drei Wochen nach Beginn der Symptome kann ein direkter Virusnachweis im Serum nicht mehr möglich sein. Im Stuhl wird das Virus hingegen für zwei weitere Wochen ausgeschieden (20,31,32).

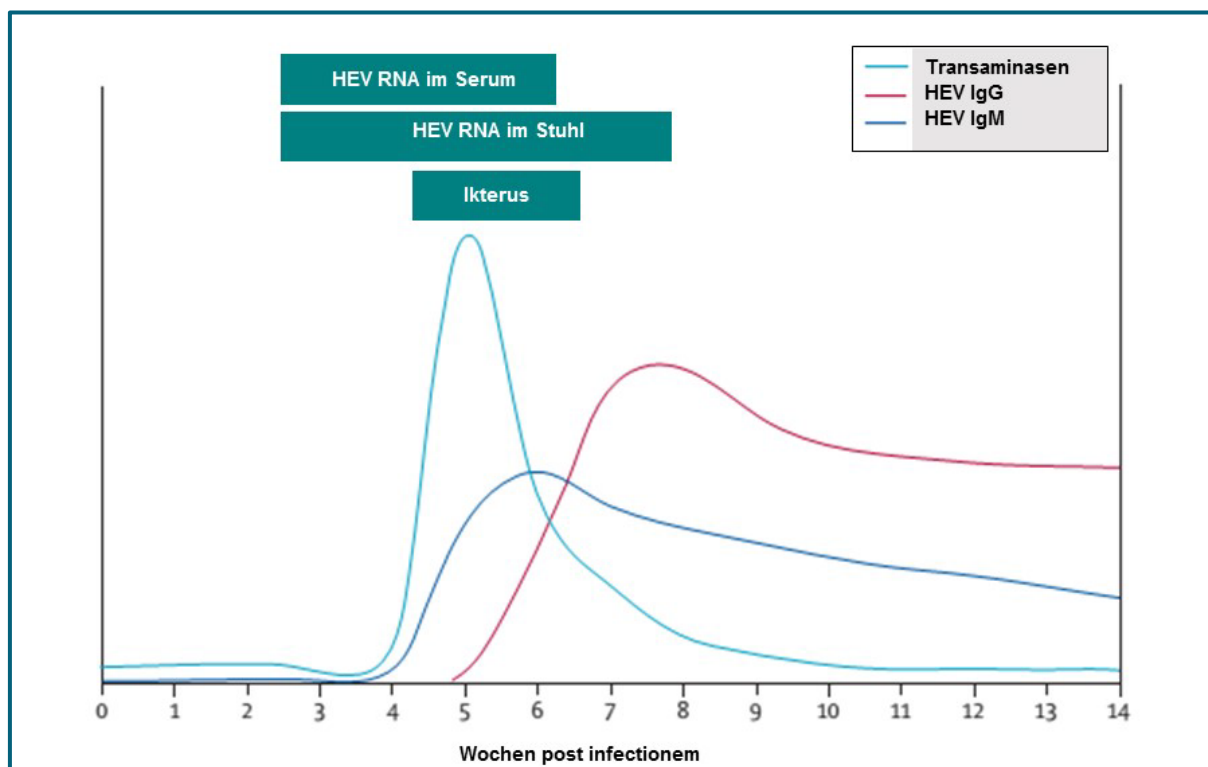


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Infektionsverlaufes (modifiziert nach (19))

1.4 Behandlung und Prophylaxe einer HEV-Infektion

Die symptomatische Hepatitis E verläuft meist selbstlimitierend und bedarf daher keiner spezifischen Therapie. Eine supportive Behandlung ist beim gesunden, immunkompetenten Patienten meist ausreichend. Bei Patienten mit vorbestehender Lebererkrankung können allerdings vermehrt fulminante Verläufe auftreten. In Einzelfällen wurde hier Ribavirin erfolgreich eingesetzt. Ein besonderes Problem besteht bei immunkompromittierten Patienten. Hierbei sind vor allem Transplantierte gefährdet, eine Chronifizierung mit Leberzirrhose zu entwickeln. In diesen Fällen ist meist eine wohlüberlegte Reduzierung der Immunsuppression ein wichtiger Baustein

der Therapie. Als Off-Label-Anwendung hat sich auch der Einsatz von Ribavirin in Einzelfällen bewährt (33).

Zur Prophylaxe der in Europa autochthonen Hepatitis E wird vor allem für Risikopatienten empfohlen, nur ausreichend durchgegartes Schweinefleisch zu verzehren. Außerhalb Europas besteht die höchste Ansteckungsgefahr durch kontaminiertes Trinkwasser, hier gilt es daher die entsprechenden Präventionsempfehlungen diesbezüglich zu beachten.

Eine Impfung gegen HEV ist derzeit nur in China verfügbar. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Impfstoff Hecolin nach dreimaliger Verabreichung einen Schutz für bis zu 4,5 Jahre gewährleistet (34).

1.5 Fragestellung der Arbeit

Wie oben bereits erwähnt gibt es nur wenige Daten, die erfassen, wie lange nach einer Infektion die spezifischen IgG-Antikörper erhalten bleiben. Insgesamt ist sehr wenig über die Immunantwort bekannt. Wie entwickelt sich die Anti-HEV-Konzentration über die Jahre hinweg? Gewährleistet eine einmalig durchgemachte Infektion eine lebenslange Immunität? Ist eine Reinfektion möglich? Kommt es im Verlauf zu negativer Serokonversion? Diese und andere Fragen sind bislang weitgehend ungeklärt. Hogema et al. zeigten in einer 2014 publizierten Studie, dass auch 23 Jahre nach Infektion noch spezifische IgG nachweisbar sind. Bei 5 der 23 Probanden fand eine negative Serokonversion statt (13). Andere Daten suggerieren eine höhere negative Serokonversionsrate (9 von 18 Probanden bei einem durchschnittlichen Follow-up von 7,4 Jahren) (35).

Ziel dieser Arbeit ist es, den noch wenig beschriebenen Langzeitantikörperstatus nach einer durchgemachten Hepatitis-E-Virusinfektion zu untersuchen. Insbesondere soll dabei den oben genannten Fragen nachgegangen werden.

2 Methodik

2.1 Zusammenstellung der Serumproben

Untersucht wurden 199 Serumproben von insgesamt 45 Probanden, davon 22 Männer und 23 Frauen. Alle Proben sind Reste von Einsendungen an das Institut für klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg und wurden stets bei -20°C gelagert.

Um in die Testreihe aufgenommen zu werden, mussten die Probanden zwei Kriterien erfüllen: Sie mussten bereits mindestens einmal positiv auf Anti-HEV-IgG getestet worden sein und es mussten mindestens zwei Serumproben, zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen, in der Serumbank vorhanden sein. Von den Probanden wurden lediglich das Geschlecht, das Geburtsdatum und die Entnahmedaten der Blutproben verwendet und ausgewertet.

2.2 Serologische Testung

Um Anti-HEV-IgG und -IgM nachzuweisen, wurden zwei kommerziell erhältliche Immunoassays der Firma Wantai (Peking, China) verwendet. Beide wurden genau nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Das Prinzip dieser Testkits beruht dabei auf den folgenden Aspekten: Im ersten Inkubationsschritt sollen die Antikörper aus dem Testmaterial, falls vorhanden, an rekombinante, virusspezifische Proteine auf einer festen Phase gebunden werden. Als feste Phase dienen mit dem Antigen beschichtete Vertiefungen („Wells“) einer Mikrotiterplatte. Anschließend erfolgen mehrere Waschschrte, um ungebundene Serumproteine zu entfernen. Danach werden an eine Peroxidase gekoppelte spezifische Anti-Immunglobulin-Antikörper (Konjugat) hinzugegeben. Diese sollen im zweiten Inkubationsschritt an die zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe binden. Auch hiernach erfolgen Waschschrte, um überschüssiges Konjugat zu entfernen. Nach anschließender Zugabe eines chromogenen Substrats kommt es zu einer durch die Peroxidase katalysierten Farbreaktion, die somit den Nachweis für die Bindung von spezifischen Antikörpern ermöglicht. Das farblose Substrat wird umgesetzt, es entsteht eine blaue Lösung. Nach Zugabe einer Stopp-Lösung erfolgt ein nochmaliger Farbumschlag zu gelb. Anschließend wird im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) die Absorption jeder Probe gemessen. Die Intensität der Färbung ist dabei proportional zur Menge an Anti-HEV-Antikörpern in

der Probe. Proben, die keine Anti-HEV-Immunglobuline enthalten, sind farblos. Zur Qualitätssicherung und Interpretation der Ergebnisse macht der Hersteller folgende Angaben: Bei jedem Test sollen pro Mikrotiterplatte zwei Positiv-Kontrollen, drei Negativ-Kontrollen und eine Leerprobe mitgemessen werden. Dabei muss die Absorption der Leerprobe kleiner 0,08, die der Negativ-Kontrollen kleiner 0,1 und die der Positiv-Kontrollen größer oder gleich 0,8 sein. Zur Berechnung des Grenzwertes (Cut-off) wird der Mittelwert der Negativ-Kontrollen ermittelt und 0,16 hinzuaddiert (liegt der Mittelwert bei kleiner 0,03, wird mit 0,03 weitergerechnet). Die Absorption eines jeden Wells wird nun durch diesen Cut-off-Wert dividiert. Dabei ist ein Ergebnis kleiner 1 als negatives Testergebnis, ein Wert größer oder gleich 1 als positiv definiert. Somit erhält man für jede getestete Serumprobe eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Anti-HEV-IgG bzw.-IgM.

Für die vorliegende Fragestellung interessiert jedoch vor allem eine quantitative Aussage über den Anti-HEV-IgG-Status der Probanden zu den verschiedenen Zeitpunkten. Denn nur so können Aussagen zum Verlauf des Antikörpertiters über die Jahre hinweg getroffen werden. Aus diesem Grund wurde eine Berechnung durchgeführt, die den semiquantitativen Wantai-ELISA in ein quantitatives Testverfahren transformiert. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe des WHO-Standardserums als Kalibrationskurve verwendet und eine sogenannte Ein-Punkt-Quantifizierung nach dem 4-Parameter-logistic-log-Modell durchgeführt. So erhielt man für jede Probe die Konzentration an Anti-HEV-IgG in WHO-Einheiten pro Milliliter (im Folgenden bezeichnet als WU/ml). Gleichzeitig konnte durch diese Methode die Inter-Assay-Varianz verringert werden.

Für unsere Testreihe wurde das WHO-Standardreagenz für Antikörper gegen das Hepatitis-E-Virus, das vom National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) (UK) hergestellt und überprüft wird (NIBSC Code: 95/584), genutzt. Das Humanserum gilt als biologischer Standard zur Berechnung von Anti-HEV-IgG-Antikörperkonzentrationen (36). Das Serum liegt bis zur Verwendung lyophilisiert vor und wird bei -20°C gelagert. Eine Ampulle des Standardserums enthält die definierte Menge von 50 WHO Einheiten an Anti-HEV-IgG. Von dieser Ausgangslösung (100 WU/ml) wird eine Verdünnungsreihe erstellt, indem jeweils 0,25 ml der vorherigen Verdünnungsstufe mit 0,25 ml Verdünnungspuffer gemischt werden. So entsteht eine Standardreihe mit 16 Lösungen in absteigender Konzentration von 100 WU/ml bis 0,003 WU/ml. Wie oben beschrieben wird jeweils die Absorption bestimmt und durch

den Cut-off dividiert. Trägt man die resultierenden Quotienten gegen die Konzentration auf, ergibt sich hierbei die typische sigmoide Kurve.

2.3 IgG-Avidität

Zur Bestimmung der Avidität der IgG-Antikörper wurde vorgegangen wie von Bendall et al. beschrieben (37). Jede Serumprobe wurde zweimal parallel auf das Vorhandensein von IgG hin untersucht. Ein Test wurde dabei konventionell, wie vom Hersteller empfohlen, durchgeführt. Der zweite Versuchsansatz wurde leicht abgewandelt, indem die ersten beiden Waschvorgänge mit einem Puffer durchgeführt wurden, der mit 5 molarem Harnstoff angereichert war. Als Aviditätsindex wurde der Quotient des Absorptionswerts in dem mit Harnstoff gewaschenen Ansatz und in dem herkömmlich gewaschenen Ansatz berechnet. Der Index wurde in Prozent angegeben. Ein Aviditätsindex, der bei kleiner oder gleich 50% liegt, gilt als niedrig, über 50% als hoch.

2.4 Definition einer HEV-Reinfektion

Ein Anstieg der Anti-HEV-IgG-Konzentration um das Vierfache wurde als Indikator für das Vorliegen einer Reinfektion festgelegt. Voraussetzung ist hierbei, dass der Proband mindestens ein Jahr zuvor positiv getestet worden war.

3 Ergebnisse

3.1 Probenkollektiv

Im Median waren von jedem Probanden drei Proben von unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten vorhanden. Zwei Proben pro Proband war dabei das Minimum, maximal standen von einem Probanden 29 Proben zur Verfügung. Im Durchschnitt konnte der Anti-HEV-IgG Status der Probanden über einen Zeitraum von 8,6 Jahren beobachtet werden (Median 8,3 Jahre). Der Status von 31 Probanden konnte über einen Zeitraum von mehr als 5 Jahren, bei 18 Probanden von mehr als 10 Jahren verfolgt werden. Die Probanden waren zu Beginn ihrer Beobachtung zwischen 22 und 76 Jahre alt, der Median lag hier bei 54 Jahren.

3.2 Endpunkt-Analyse

In allen getesteten Proben konnte Anti-HEV-IgG in einer Konzentration zwischen 0,4 und 161,0 WU/ml nachgewiesen werden. Die Startwerte lagen dabei zwischen 0,7 und 158,7 WU/ml, die Endwerte zwischen 0,4 und 104,2 WU/ml. Da von den einzelnen Probanden eine sehr unterschiedliche Anzahl an Serumproben zur Verfügung stand, wurde zunächst folgende Vereinfachung durchgeführt, um einen groben Überblick über die Daten zu erhalten: Von jedem Probanden wurde nur der erste und der letzte verfügbare Wert betrachtet. Der Startpunkt des Beobachtungszeitraums wurde als Zeitpunkt 0 festgelegt, der Endpunkt war bei jedem Probanden individuell, je nach Beobachtungsdauer. 18 der 45 Probanden hatten nach 0,7 bis 17 Jahren ähnliche Konzentrationen an Anti-HEV-IgG. Die Abweichung von End- zu Startwert lag in dieser Gruppe bei maximal +/- 20% (-10,5 % bis +18,9 %). 17 Probanden zeigten einen Abfall der Konzentration um mehr als 20 % (22,9 % bis 87,1 %) nach 2,7 bis 16 Jahren. Ein Anstieg um mehr als 20 % (24,9 % - 280,5 %) wurde bei 10 Probanden beobachtet. Hier lag der Zeitraum zwischen 1,3 und 15 Jahren.

Das erste Serum jedes Probanden wurde zusätzlich noch auf das Vorliegen von IgM hin untersucht, zudem wurde die Avidität der IgG bestimmt. Bei 3 der 45 Probanden konnten zu Beginn des Beobachtungszeitraums neben IgG auch IgM gefunden werden. Alle drei hatten relativ hohe IgG-Ausgangskonzentrationen von 32,7, 70,1 und 96,7 WU/ml. Bemerkenswerterweise waren die IgG-Antikörper hoch avide.

Drei weitere Probanden hatten einen niedrigen initialen Aviditätsindex von $\leq 50\%$. Hier lag die Ausgangskonzentration an IgG unterhalb des Gesamtmedians von 11,6 WU/ml (5,1, 5,9, 8,8 WU/ml). Bei zwei Probanden konnte die initiale Avidität nicht bestimmt werden, da der Absorptionswert zu gering war (Patient 1: 0,35, Patient 33: 0,18). Die Avidität konnte nur von IgG-positiven Proben bestimmt werden, welche unverdünnt eine Absorption größer 0,4 hatten.

3.3 Konzentrationsdynamik

Da von den meisten Probanden (30 von 45) mehr als 2 Seren zur Verfügung standen, ermöglichte dies einen detaillierteren Einblick in die individuelle Entwicklung der Anti-HEV-Konzentrationen. In vier Fällen (8,8%) ergaben sich Hinweise auf eine Reinfektion: Proband 5 (9 Proben, 14,9 Jahre), Proband 19 (21 Proben, 15,8 Jahre), Proband 40 (29 Proben, 17,0 Jahre) und Proband 41 (7 Proben, 15,6 Jahre).

50% der Proben von Proband 5 zeigten Anti-HEV-IgG-Konzentrationen um 10 WU/ml. Jedoch fiel die Konzentration zu Beginn nach einem Maximum von 30,3 auf 1,7 WU/ml ab. Fünf Jahre später hatte sie sich erneut verzehnfacht, auf 17,6 WU/ml. Dies legt den Verdacht auf eine Reinfektion nahe.

75% der Proben von Proband 19 und Proband 40 hatten Anti-HEV-IgG-Konzentrationen von ca. 9 WU/ml. Die verbleibenden Proben von Proband 19 zeigten Konzentrationsabfälle bis auf 0,7–2,2 WU/ml innerhalb von 4–12 Wochen. Nach jedem dieser vier Konzentrationsabfälle konnten Zeichen einer Reinfektion gefunden werden: 5,4- bis 14,4-fache Titeranstiege über Zeiträume von 1,2–3,4 Jahren. Im Gegensatz dazu konnten in den restlichen Proben von Proband 40 ausschließlich Konzentrationen über 9 WU/ml gefunden werden. Jedoch erfüllt nur einer der vier beobachteten Anstiege die Kriterien einer Reinfektion.

Der initiale Titer von Proband 41 fiel innerhalb von 13,8 Jahren von 36,7 auf 3,2 WU/ml, gefolgt von einer Reinfektion (10,6-facher Titeranstieg).

Alle Proben mit einem mindestens 4-fachen Anti-HEV-IgG-Konzentrationsanstieg wurden negativ auf Anti-HEV-IgM getestet. Diese Daten zeigen, dass auch Jahre nach dem ersten Nachweis von hoch aviden Anti-HEV-IgG-Antikörpern noch Titeranstiege auftreten können. Andererseits werden über die Zeit hinweg auch Konzentrationsabfälle oder relativ konstante Verläufe beobachtet.

Die Anti-HEV-IgG-Konzentration von Proband 27 nahm über einen Zeitraum von 12,5 Jahren kontinuierlich ab, von initial gemessenen 18,6 auf 1,9 WU/ml. Anschließend blieb der Titer für weitere 3,2 Jahre weitgehend konstant.

Proband 34 zeigte ebenfalls einen stetigen Abfall der initialen Anti-HEV-IgG-Konzentration von 122,0 WU/ml. Dieser Titer sank in 5,3 Jahren schrittweise auf 44,7 WU/ml ab. Nach 3,9 Jahren stieg er erneut bis auf 77,4 WU/ml an, um dann innerhalb von 3,8 Jahren wieder auf 29,0 WU/ml abzufallen.

3.4 Gesamttrend

Neben den unterschiedlichen Einzelverläufen sollten die Kollektivdaten auch hinsichtlich eines Gesamttrends untersucht werden: Hierzu wurden alle Serumproben in vier Gruppen eingeteilt, abhängig davon, wie viel Zeit seit der Entnahme der ersten Probe vergangen war. So entstand je eine Gruppe für einen mittleren Abstand von 1 Jahr, 5 Jahren, 10 Jahren und 15 Jahren.

Die Mittelwerte jeder Gruppe wurden mit den Mittelwerten der entsprechenden Startgruppe verglichen. Nach 5 (-5,9 WU/ml, $p=0,13$), 10 (-7,3 WU/ml, $p=0,04$) und 15 Jahren (-14 WU/ml, $p<0,001$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) zeigte sich ein signifikanter Abfall der Anti-HEV-IgG-Konzentration. Diese Ergebnisse sprechen für eine insgesamt kontinuierliche Abnahme der Titer in diesem Probandenkollektiv.

4 Diskussion

In dieser Studie wurde die langfristige Entwicklung der Anti-HEV-IgG-Konzentration sowie die Häufigkeit einer negativen Serokonversion untersucht.

Die Ergebnisse zeigen: a) Die Anti-HEV-Ig-Konzentration im Serum kann auch Jahre nach dem ersten Nachweis von hoch aviden Antikörpern noch ansteigen, kann aber auch relativ konstant bleiben. Zusammenfassend lässt sich ein Trend hin zum Konzentrationsabfall finden, der nach frühestens fünf Jahren beginnt und der mit der Zeit zunehmend ausgeprägt wird. b) Eine negative Serokonversion wird nur bei einem von 45 Probanden nach 9,7 Jahren gefunden. c) Bei vier der 45 Probanden ergeben sich Hinweise auf eine mögliche Reinfektion.

Eine Studie von Hogema et al. (13) zeigt einen geringeren und langsameren Abfall der Anti-HEV-IgG-Konzentration im Serum. Neun von 23 Probanden (39%) verlieren hier in durchschnittlich 23,1 Jahren mehr als 50% ihrer spezifischen Antikörper, teilweise findet sogar eine negative Serokonversion statt. In unserer Studie nimmt die Anti-HEV-IgG-Konzentration bei 17 von 45 Probanden (38%) über einen durchschnittlichen Zeitraum von 10,2 Jahren ab.

Im Gegensatz dazu steht der relativ schnelle Abfall der Anti-HEV-IgG-Konzentration in einer Untersuchung zur Langzeitwirkung eines Hepatitis-E-Impfstoffes (34). Einen Monat nach Erhalt der dritten Impfdosis wird im Serum der Probanden, bei denen ein mindestens vierfacher Titeranstieg nachgewiesen werden konnte, eine mittlere Anti-HEV-IgG-Konzentration von 19,0 WU/ml gemessen (38). Diese sinkt innerhalb von 4,5 Jahren kontinuierlich ab bis auf 0,27 WU/ml. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Dynamik der Antikörperkonzentration nach einer natürlichen Infektion nicht mit der nach einer Impfung zu vergleichen ist. Daher ist Vorsicht geboten, wenn Studien mit diesen unterschiedlichen Rahmenbedingungen verglichen werden. Unsere Daten (nach natürlicher Infektion) zeigen nach im Mittel 4,6 Jahren einen weniger ausgeprägten Titerabfall von 18,7 WU/ml auf 12,8 WU/ml. Dieser bemerkenswerte Unterschied in der humoralen Immunantwort ist besonders interessant, wenn man bedenkt, dass eine Anti-HEV-IgG-Konzentration von kleiner 7 WU/ml bei Organempfängern scheinbar nicht vor einer Reinfektion schützt (39). Mehr noch, bei einem gesunden Probanden wird sogar trotz eines bestehenden Titers von 12 WU/ml eine Reinfektion beschrieben (35).

In unserer Studie enthält jedes Folgeserum Anti-HEV-IgG zwischen 0,4 und 161,0 WU/ml. Bei vier Probanden legt der individuelle Verlauf mit einer Zunahme der initialen Konzentration an hoch avidem Anti-HEV-IgG um das Vierfache den Verdacht auf eine Reinfektion nahe. Hervorzuheben ist hier, dass die vorangehende Anti-HEV-IgG-Konzentration jeweils unter 7 WU/ml (0,7–6,4 WU/ml) liegt. Bei einem dieser vier Probanden sind sogar viermal in Folge, in Abständen zwischen 1,2 und 3,4 Jahren die Kriterien einer Reinfektion erfüllt. Jedes Serum mit einem mehr als vierfachen Titeranstieg wurde negativ auf Anti-HEV-IgM getestet.

Gemäß den Angaben des Herstellers zum Cut-off-Wert liegt ausschließlich bei einem Probanden eine negative Serokonversion nach 9,7 Jahren vor. Diese geringe Inzidenz von 2% steht im Gegensatz zu den hohen Raten von 22% (13) und 50% (35), die in anderen Untersuchungen gefunden wurden. Allen Probanden mit negativer Serokonversion ist eine niedrige initiale Anti-HEV-IgG-Konzentration gemeinsam.

Bedenkt man, dass der Kontakt zum Hepatitis-E-Virus meist durch orale Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln zustande kommt, ist folgender Mechanismus denkbar: Nach Viruskontakt entsteht an der Darmmukosa eine HEV-spezifische Immunität (evtl. vermittelt durch Antikörper der Klasse IgA). Nach dem Eindringen des Virus in die Schleimhaut des Darms entwickeln sich dann auch neutralisierende IgG-Antikörper, die im Serum nachweisbar werden. Diese Mechanismen der humoralen Immunantwort sind jedoch noch wenig verstanden. Durch das weitverbreitete Vorkommen des Hepatitis-E-Virus in Schweinefleischprodukten und Innereien könnte durch die wiederholte Virusexposition im Darm eine wiederholte „Boosterung“ bei bereits HEV-IgG-positiven Probanden erfolgen. Jedoch zeigen unsere Daten, dass auch dieser potentielle Effekt offenbar keine lebenslange Immunität verleiht.

Bei der Interpretation unserer Ergebnisse sind gewisse Einschränkungen zu beachten: Zum einen wissen wir nicht, wie lange nach der Infektion die einzelnen Serumproben abgenommen wurden, zum anderen fehlen Informationen über Medikation und Begleiterkrankungen der Probanden.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten einen signifikanten Abfall der Anti-HEV-IgG-Konzentration innerhalb eines Zeitraumes von wenigstens fünf Jahren. Eine negative Serokonversion tritt hierbei jedoch nur selten auf. Serologische Hinweise auf eine HEV-Reinfektion ergaben sich bei 9% der untersuchten Probanden.

5 Ausblick

In den letzten Jahren kommt der Infektion mit dem Hepatitis-E-Virus eine gesteigerte Aufmerksamkeit zu. Lange Zeit wurde die fünfte Form der Virushepatitiden als exotische Reiseinfektion verkannt. Viele neue Aspekte haben sich in den letzten Jahren ergeben und zeigen, dass noch zu wenig über dieses in den 1980er Jahren erstmals entdeckte Virus bekannt ist. Neben der harmlosen, oft asymptomatischen Verlaufsform stellt die Infektion für chronisch leberkranke Patienten oder Immunsupprimierte eine große Gefahr dar. Dazu kommt, dass die Übertragung doch nicht, wie bisher angenommen, nur fäkal-oral oder durch den Verzehr von kontaminiertem Fleisch möglich ist, sondern auch parenteral über infizierte Blutprodukte. Gegenstand intensiver Diskussion in der Transfusionsmedizin ist derzeit, ob in Zukunft bei Blutspendern ein Screening auf HEV notwendig sein wird. Auch zur Immunantwort bleiben noch viele Fragen offen. Die oben gezeigten Daten suggerieren, dass eine einmalige Infektion wohl keine lebenslange Immunität verleiht, eventuell sogar multiple Reinfektionen möglich sind und die Antikörper insgesamt über die Jahre hinweg auf nicht nachweisbare Konzentrationen absinken. Denkbar wäre aber auch, dass die schwankenden Antikörper-Titer Ausdruck einer stetigen Reexposition und Boosterung durch den wiederkehrenden Viruskontakt über den Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel sind. Weitere Studien sind notwendig, um dies aufzuklären.

6 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (RKI). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016. Krankenhaus-Hygiene + Infektionsverhütung. 2016;38(4):178–83. doi:10.1016/j.khinf.2016.07.003
2. World Health Organization. Hepatitis E. 2014. [abgerufen am 31.07.2014 unter <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>]
3. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology. 1983;20(1):23–31. eng.
4. Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U. Molekulare Virologie. 3rd ed. Heidelberg, Neckar: Spektrum Akademischer Verlag; 2008. 640 S.
5. Purdy MA, Khudyakov YE. The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. Virus Research. 2011;161(1):31–9. doi:10.1016/j.virusres.2011.04.030
6. Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. Replicative and Evolutionary Aspects of Hepatitis Viruses. 2007;127(2):216–28. doi:10.1016/j.virusres.2007.02.002
7. Krawczynski K, Bradley DW. Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis: Identification of Virus-Associated Antigen in Experimentally Infected Cynomolgus Macaques. Journal of Infectious Diseases. 1989;159(6):1042–9. doi:10.1093/infdis/159.6.1042
8. Krawczynski K, Meng X-J, Rybczynska J. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. Virus Research. 2011;161(1):78–83. eng. doi:10.1016/j.virusres.2011.03.007
9. Van der Poel, Wim H M. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. Current Opinion in Virology. 2014;491–6. eng. doi:10.1016/j.coviro.2014.01.006
10. Li T-C, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. Emerging Infectious Diseases. 2005;11(12):1958–60. eng. doi:10.3201/eid1112.051041

11. Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, Jilg W. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *Journal of Clinical Virology*. 2011;52(1):50–4. eng. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.006
12. Faber MS, Wenzel JJ, Jilg W, Thamm M, Höhle M, Stark K. Hepatitis E Virus Seroprevalence among Adults, Germany. *Emerging Infectious Diseases*. 2012;18(10):1654–7. doi:10.3201/eid1810.111756
13. Hogema BM, Molier M, Slot E, Zaaier HL. Past and present of hepatitis E in the Netherlands. *Transfusion*. 2014;54(12):3092–6. doi:10.1111/trf.12733
14. Mansuy J-M, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Sauné K, Miédouge M, Ellis V, Rech H, Destruel F, Kamar N, Dalton HR, Izopet J. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(12):2309–12. eng. doi:10.3201/eid1712.110371
15. Robert Koch-Institut (RKI). *Epidemiologisches Bulletin* 15/2015. 2015.
16. Wenzel JJ, Sichler M, Schemmerer M, Behrens G, Leitzmann MF, Jilg W. Decline in hepatitis E virus antibody prevalence in Southeastern Germany, 1996-2011. *Hepatology*. 2014. ENG. doi:10.1002/hep.27244
17. Hewitt PE, Ijaz S, Brailsford SR, Brett R, Dicks S, Haywood B, Kennedy, Iain T R, Kitchen A, Patel P, Poh J, Russell K, Tettmar KI, Tossell J, Ushiro-Lumb I, Tedder RS. Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in southeast England. *The Lancet*. 2014;384(9956):1766–73. doi:10.1016/S0140-6736(14)61034-5
18. Pawlotsky J-M. Hepatitis E screening for blood donations: an urgent need? *The Lancet*. 2014;384(9956):1729–30. doi:10.1016/S0140-6736(14)61187-9
19. Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *The Lancet Infectious Diseases*. 2008;8(11):698–709. doi:10.1016/S1473-3099(08)70255-X
20. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014;27(1):116–38. doi:10.1128/CMR.00057-13
21. Pfefferle S, Frickmann H, Gabriel M, Schmitz N, Günther S, Schmidt-Chanasit J. Fatal course of an autochthonous hepatitis E virus infection in a patient with

- leukemia in Germany. *Infection*. 2012;40(4):451–4. doi:10.1007/s15010-011-0220-7
22. Gauss A, Wenzel JJ, Flechtenmacher C, Navid M, Eisenbach C, Jilg W, Stremmel W, Schnitzler P. Chronic hepatitis E virus infection in a patient with leukemia and elevated transaminases: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2012;6(1):334. doi:10.1186/1752-1947-6-334
23. Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, Pahl S, Ramez B, Krüger DH, Berg T, Hofmann J. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *Journal of Hepatology*. 2012;56(2):500–2. doi:10.1016/j.jhep.2011.06.021
24. Kumar A, Beniwal M, Kar P, Sharma JB, Murthy NS. Hepatitis E in pregnancy. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2004;85(3):240–4. doi:10.1016/j.ijgo.2003.11.018
25. Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *Journal of Medical Virology*. 2008;80(4):646–58. doi:10.1002/jmv.21116
26. Tabatabai J, Wenzel JJ, Soboletzki M, Flux C, Navid MH, Schnitzler P. First case report of an acute hepatitis E subgenotype 3c infection during pregnancy in Germany. *Journal of Clinical Virology*. 2014;61(1):170–2. doi:10.1016/j.jcv.2014.06.008
27. Anty R, Ollier L, Péron JM, Nicand E, Cannavo I, Bongain A, Giordanengo V, Tran A. First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *Journal of Clinical Virology*. 2012;54(1):76–8. doi:10.1016/j.jcv.2012.01.016
28. Kamar N, Bendall RP, Peron JM, Cintas P, Prudhomme L, Mansuy JM, Rostaing L, Keane F, Ijaz S, Izopet J, Dalton HR. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17(2):173–9. doi:10.3201/eid1702.100856
29. Loly JP. Guillain-Barré syndrome following hepatitis E. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(13):1645. doi:10.3748/wjg.15.1645
30. Scharn N, Ganzenmueller T, Wenzel JJ, Dengler R, Heim A, Wegner F. Guillain–Barré syndrome associated with autochthonous infection by hepatitis E

- virus subgenotype 3c. *Infection*. 2014;42(1):171–3. doi:10.1007/s15010-013-0448-5
31. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, Cai J, Jiang L, Wu T, Wang Z, Guan L, Shih, J Wai Kuo, Ng M-H, Zhu F, Zhang J, Xia N. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e13560. eng. doi:10.1371/journal.pone.0013560
32. Krain LJ, Nelson KE, Labrique AB. Host Immune Status and Response to Hepatitis E Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014;27(1):139–65. doi:10.1128/CMR.00062-13
33. Kamar N, Lhomme S, Abravanel F, Marion O, Peron J-M, Alric L, Izopet J. Treatment of HEV Infection in Patients with a Solid-Organ Transplant and Chronic Hepatitis. *Viruses*. 2016;8(8). doi:10.3390/v8080222
34. Zhang J, Zhang X-F, Huang S-J, Wu T, Hu Y-M, Wang Z-Z, Wang H, Jiang H-M, Wang Y-J, Yan Q, Guo M, Liu X-H, Li J-X, Yang C-L, Tang Q, Jiang R-J, Pan H-R, Li Y-M, Shih JW-K, Ng M-H, Zhu F-C, Xia N-S. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(10):914–22. doi:10.1056/NEJMoa1406011
35. Servant-Delmas A, Abravanel F, Lefrere J-J, Lionnet F, Hamon C, Izopet J, Laperche S. New insights into the natural history of hepatitis E virus infection through a longitudinal study of multitransfused immunocompetent patients in France. *Journal of Viral Hepatitis*. 2016;23(7):569–75. doi:10.1111/jvh.12531
36. Ferguson M, Walker D, Mast E, Fields H. Report of a Collaborative Study to Assess the Suitability of a Reference Reagent for Antibodies to Hepatitis E Virus. *Biologicals*. 2002;30(1):43–8. doi:10.1006/biol.2001.0315
37. Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Thurairajah P, Dalton HR. Serological response to hepatitis E virus genotype 3 infection: IgG quantitation, avidity, and IgM response. *Journal of Medical Virology*. 2008;80(1):95–101. eng. doi:10.1002/jmv.21033
38. Zhu F-C, Zhang J, Zhang X-F, Zhou C, Wang Z-Z, Huang S-J, Wang H, Yang C-L, Jiang H-M, Cai J-P, Wang Y-J, Ai X, Hu Y-M, Tang Q, Yao X, Yan Q, Xian Y-L, Wu T, Li Y-M, Miao J, Ng M-H, Shih JW-K, Xia N-S. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised,

- double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2010;376(9744):895–902. doi:10.1016/S0140-6736(10)61030-6
39. Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy J-M, Muscari F, Sallusto F, Rostaing L, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients can evolve into chronic infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;209(12):1900–6. eng. doi:10.1093/infdis/jiu032

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Genomorganisation des Hepatitis-E-Virus (modifiziert nach(4))..... 2

Abb. 2: Schematische Darstellung des Infektionsverlaufes (modifiziert nach (19)) 5

Received: 14 July 2016 | Accepted: 19 August 2016
DOI: 10.1111/jvh.12621

ORIGINAL ARTICLE

WILEY 

Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults

M. Schemmerer | C. Rauh | W. Jilg | J. J. Wenzel

Institute of Clinical Microbiology and Hygiene, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany

Correspondence

Jürgen J. Wenzel, Institute of Clinical Microbiology and Hygiene, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany.
Email: juergen.wenzel@ukr.de.

Summary

Hepatitis E virus (HEV) is highly endemic in industrialized countries, but there is a lack of knowledge on individual and overall antibody concentration dynamics. The aim of this study was to characterize longitudinal concentration changes of anti-HEV immunoglobulin G (anti-HEV IgG) by enzyme immunoassay (EIA). In total, 199 serum samples collected from 45 subjects over 18 years were analysed. A wide range of anti-HEV IgG levels was found. Overall, anti-HEV IgG significantly decreased after an observation period of at least 5 years. One negative seroconversion was observed. Four individual profiles suggested single and even multiple HEV reinfections despite pre-existing HEV antibodies.

KEYWORDS

antibody dynamics, anti-HEV IgG, hepatitis E virus, negative seroconversion, reinfection

1 | INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is a small nonenveloped single-stranded RNA virus belonging to the family *Hepeviridae* within the genus *Orthohepevirus*.¹ Five genotypes of HEV that infect humans are known so far, all representing one single serotype. Genotypes 1 and 2 are restricted to humans and are associated with large outbreaks in developing countries, while genotypes 3 and 4 infect pigs, wild boars and other mammals. It has been shown in several studies that genotypes 3 and 4 virus strains are transmitted zoonotically to humans. In most cases, transmissions are probably food-borne and linked to the consumption of raw or undercooked meat from pigs, wild boars and deer.² This notion is supported by the fact that in some reported cases of sporadic autochthonous hepatitis E, the viral genome sequence in the animal source and the human host are nearly identical.^{3,4}

In Europe, infections with HEV genotype 3 are more common than expected. Anti-HEV prevalence estimates reported from different European countries are surprisingly high.⁵⁻⁷ Infections with genotype 3 mostly remain asymptomatic in immunocompetent patients, are self-limiting and hence remain undiagnosed.

The incubation period of autochthonous hepatitis E ranges from 2 to 9 weeks.⁸ The immune reaction to HEV starts with a short-lived

immunoglobulin M (IgM) response. At the time of clinical presentation, the anti-HEV IgM level has already peaked, but it remains high for another 8 weeks. Afterwards, the IgM level declines and becomes undetectable in most patients after about 32 weeks.⁹ In contrast, anti-HEV immunoglobulin G (IgG) levels are rising when the first symptoms appear and reach their peak level after about 4 weeks.⁹ Anti-HEV IgG remains at high levels for more than 1 year,⁹ but the exact duration remains unclear. One study demonstrated that anti-HEV IgG in most cases remains detectable over a period of 23 years and only five of 23 patients reverted to seronegativity,⁶ whereas a recently published study showed a higher rate of reversion to seronegativity (nine of 18 subjects) after a mean follow-up of 7.4 years.¹⁰

In this context, the aim of our work was to investigate (i) the general anti-HEV IgG concentration dynamics in our study population over time, (ii) to determine whether and how frequently reversion to seronegativity occurs and (iii) to assess the presence and frequency of reinfections.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample collection

A total of 199 serum samples from 23 females and 22 males were analysed. All specimens were obtained as part of the daily routine operations of our diagnostic laboratory in 1996 through 2013. Study subjects were chosen based on two criteria: (i) they had tested

Abbreviations: HEV, hepatitis E virus; SCR, signal-to-cut-off ratio; WHO, World Health Organization.

M. S. and C. R. contributed equally to the study.

positive for anti-HEV IgG, and (ii) at least one serum of the same person at another point in time was available. Only surplus serum stored at -20°C was analysed.

2.2 | Serological analysis

Collected samples were tested for anti-HEV IgG (and in a subset for IgM) using commercially available immunoassays (Wantai, Beijing, China). Both assays were performed according to the manufacturer's instructions.

The World Health Organization (WHO) reference reagent for antibodies to HEV (NIBSC code: 95/584) was used in order to determine anti-HEV IgG concentrations.¹¹ Briefly, a twofold dilution series of the reference reagent was prepared, ranging from 2^0 (undiluted) to 2^{-15} . The range of concentrations for the WHO reagent started from 100 WHO Units per mL (WU mL^{-1}) and ended with $3.05 \times 10^{-3} \text{ WU mL}^{-1}$. The plot of signal-to-cut-off ratio (SCR) vs concentration shows a typical sigmoidal curve (Figure 1).

Conversion of SCR to WU and compensation for interassay variation was achieved by single-point quantification using a four-parameter logistic-log model. The linear range started with 0.18 WU mL^{-1} and ended with 2.40 WU mL^{-1} . The qualitative cut-off as defined by the manufacturer was 0.50 WU mL^{-1} .

2.3 | IgG avidity

Avidity was determined as described by Bendall et al.¹² Briefly, samples were tested for IgG in parallel, whereby one test was performed according to the manufacturer's instructions. The second test was modified by performing the first two washing steps with washing buffer containing 5 mol L^{-1} urea. Soak times were 5 minutes for the first two washing steps and 30 seconds for following washing steps. The avidity index was expressed as percentage of the urea-treated well's OD in relation to the untreated well's OD,

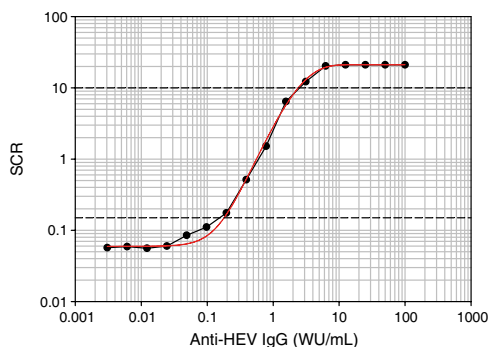


FIGURE 1 Signal-to-cut-off ratio (SCR) vs concentration of the World Health Organization (WHO) reference reagent for antibodies to HEV as tested by enzyme immunoassay (EIA). Anti-HEV IgG, anti-HEV immunoglobulin G; WU, WHO units

given that both ODs were in the range of 0.4–3.0. Samples with ODs <0.4 were uninterpretable. Samples with ODs >3.0 were diluted and retested. Avidity indices $\leq 50\%$ were assigned as low, $>50\%$ as high.

2.4 | Definition of HEV reinfection

A rise of anti-HEV IgG by at least fourfold was considered as indication for reinfection, provided that the subject tested positive for anti-HEV IgG ($>0.50 \text{ WU mL}^{-1}$) at least 1 year before.

3 | RESULTS

3.1 | Test collective

The number of available samples and their distribution between the subjects is summarized in Table S1. The median number of available specimens was 3 per subject (range: 2–29). We observed the subjects' anti-HEV IgG status for an average period of 8.6 years. The median was 8.3 years (range: 0.7–17.0). Thirty-one subjects were observed for more than 5 years, 18 were observed for more than 10 years.

At the beginning of the observation, the subjects' median age was 54 years (range: 22–76). A correlation between antibody level and age was not observed.

3.2 | Endpoint analysis

Every specimen contained detectable anti-HEV IgG ranging from 0.4 to 161.0 WU mL^{-1} (Figure 2A). The subjects' initial anti-HEV IgG levels ranged from 0.7 to 158.7 WU mL^{-1} , and final antibody concentrations ranged from 0.4 to 104.2 WU mL^{-1} .

Due to different number of samples per subject and their inconstant distribution over time, only initial and final anti-HEV IgG concentrations are shown in Figure 2B. The starting point of the observation period was set to 0. The endpoint corresponds to the individual elapsed time between the first and the last tested serum.

Eighteen of 45 subjects had similar anti-HEV IgG concentrations after 0.7–17 years with deviations of $\leq 20\%$ (-10.5% – 18.9%) compared to the initial concentration. Seventeen subjects showed a decrease of $>20\%$ (22.9% – 87.1%) after 2.7–16 years. Ten subjects had an increased antibody level of $>20\%$ (24.9% – 280.5%) after 1.3–15 years.

All three observed anti-HEV IgG patterns over time (i.e. constant, decreasing, increasing) can be seen over the whole range of measured initial anti-HEV IgG concentrations with the exception of the four subjects with the highest initial anti-HEV IgG concentrations, which solely declined over time.

Each subject's initial serum was also tested for anti-HEV IgM and avidity of anti-HEV IgG. Three of 45 subjects were anti-HEV IgM positive at the beginning of the observation period and had high initial anti-HEV IgG concentrations of 32.7, 70.1 and 96.7 WU mL^{-1} . Remarkably, IgG antibodies were of high avidity.

Another three subjects had initial IgG avidity indices of $\leq 50\%$. The initial anti-HEV IgG concentrations of these subjects were below the collective's median anti-HEV IgG level of 11.6 WU mL^{-1} with concentrations of 5.1, 5.9 and 8.8 WU mL^{-1} . The avidity of two subjects was indeterminable.

3.3 | Concentration dynamics

The longitudinal trend of the anti-HEV IgG by endpoint analysis is shown in Figure 2B. For 30 of 45 tested subjects, 3-29 consecutive sera were available for analysis and allowed drawing a more detailed picture of individual concentration changes over time. Four individual courses (8.8%) indicated reinfections: subject #5 (9 sera over 14.9 years), #19 (21 sera over 15.8 years), #40 (29 sera over 17.0 years) and #41 (7 sera over 15.6 years; Figure 3).

Fifty per cent of the sera from subject #5 showed anti-HEV IgG concentrations at around 10 WU mL^{-1} . However, the concentration initially dropped after a peak at 30.3 to 1.7 WU mL^{-1} . Five years later, the concentration had increased 10.6-fold to 17.6 WU mL^{-1} , indicating a reinfection.

Seventy-five per cent of the sera from subject #19 and #40 had anti-HEV IgG concentrations at around 9 WU mL^{-1} . The remaining sera of subject #19 showed reductions of anti-HEV IgG to concentrations of 0.7 - 2.2 WU mL^{-1} within 4-12 weeks. After each of these four concentration drops, we observed indications of reinfections as measured by 5.4- to 14.4-fold antibody increases in intervals of 1.2-3.4 years.

In contrast, only anti-HEV IgG levels higher than 9 WU mL^{-1} were detected in the remaining quarter of samples from subject #40. However, only one of the observed four increases met the definition of a reinfection.

FIGURE 2 (A), Quantitative results for anti-HEV IgG in World Health Organization Units per mL (WU mL^{-1}), shown as box-and-whisker diagram. The box includes a median line and represents 25th and 75th percentiles; whiskers represent 10th and 90th percentiles; solid data points represent outliers. (B), Initial and final measured anti-HEV IgG concentrations over time, normalized to fold-change values. The calculated arithmetic mean of all subjects is represented by a bold line with diamond end. A dashed line represents the level of no change

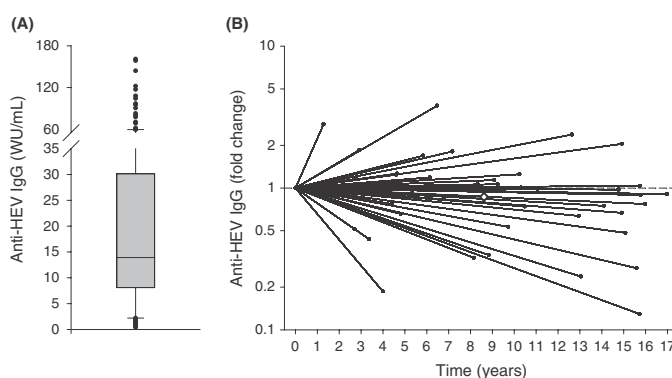
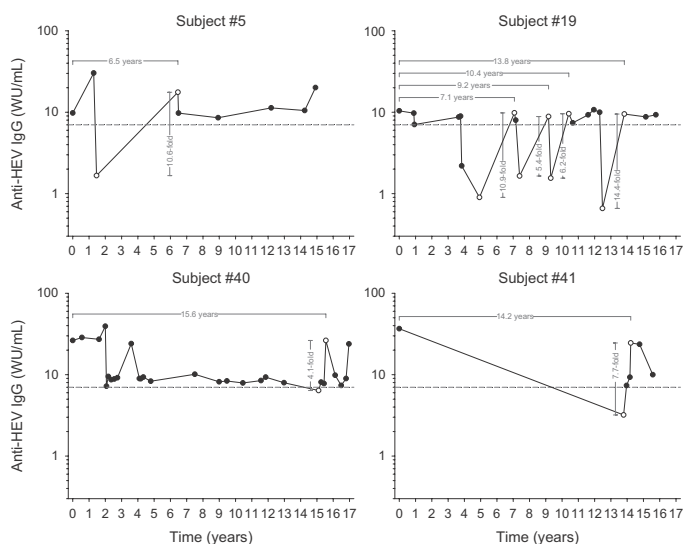


FIGURE 3 Anti-hepatitis E virus immunoglobulin G (anti-HEV IgG) concentration profiles of subjects who meet the definition of HEV reinfection. Open data points mark reinfection events. Grey vertical lines indicate concentration changes, and grey horizontal lines indicate the respective time interval. A horizontal dashed line in each panel highlights the putatively protective anti-HEV IgG concentration of 7 World Health Organization Units per mL (WU mL^{-1})



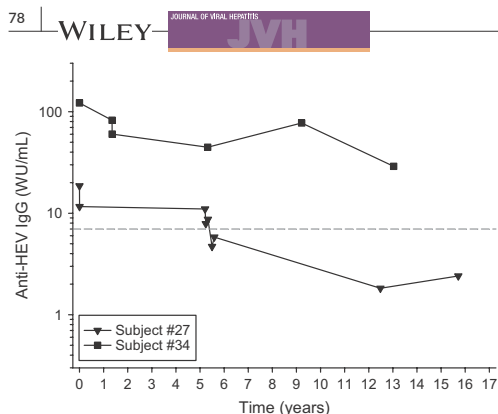


FIGURE 4 Representative anti-HEV IgG concentration profiles of subjects who show an overall decreasing trend of anti-HEV IgG levels. A horizontal dashed line highlights the putatively protective anti-HEV IgG concentration of 7 World Health Organization Units per mL (WU mL^{-1})

TABLE 1 Characteristics of the 1-15-year groups

	1-y Group	5-y Group	10-y Group	15-y Group
Period	≤ 2.5 y	2.6-7.5 y	7.6-12.5 y	12.6-17.0 y
Samples	47	49	29	30
Subjects	26	23	16	14

The initial anti-HEV IgG concentration of subject #41 decreased from 36.7 to 3.2 WU mL^{-1} within 13.8 years, followed by a reinfection (7.7-fold antibody increase).

All sera with an anti-HEV IgG increase of at least fourfold were negative for anti-HEV IgM. These data show that anti-HEV IgG concentration increases can occur years after an initial positive detection of IgG of high avidity. On the other hand, rather constant or decreasing antibody concentrations over time were also observed (Figure 4).

The anti-HEV IgG concentration of subject #27 constantly dropped from initially measured 18.6 to 1.9 WU mL^{-1} within 12.5 years and stayed around that level for another 3.2 years.

Subject #34 also shows an overall decreasing trend of anti-HEV IgG starting with a concentration of 122.0 WU mL^{-1} . This concentration steadily decreased to 44.7 WU mL^{-1} within 5.3 years. After 3.9 years, the anti-HEV IgG level rose back to 77.4 WU mL^{-1} and dropped again to 29.0 WU mL^{-1} within another 3.8 years.

3.4 | Overall trend of anti-HEV IgG

The study collective was also examined for an overall trend of anti-HEV IgG concentration over time. All samples were categorized into four groups according to the time period between initial and final sampling (Table 1).

The geometric means of the respective initial anti-HEV IgG concentrations were compared with the corresponding final concentrations (Figure 5). Anti-HEV IgG levels have significantly decreased

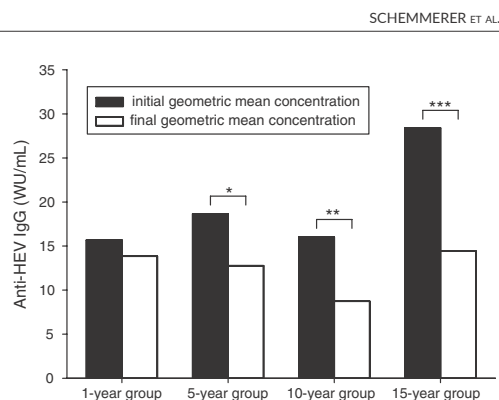


FIGURE 5 Geometric mean concentrations of anti-HEV IgG in four sample groups. Initial concentrations were compared with the corresponding final values. Statistical analysis was performed by the Wilcoxon signed-rank test; *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$. WU, World Health Organization Units

in the 5-year group (-5.9 WU mL^{-1} ; $P = .013$), in the 10-year group (-7.3 WU mL^{-1} ; $P = .004$) and in the 15-year group (-14.0 WU mL^{-1} ; $P < .001$; Wilcoxon Signed-Rank test). These findings demonstrate a continual overall decrease of anti-HEV IgG levels in the study collective in the past decades.

4 | DISCUSSION

In this study, we investigated anti-HEV IgG concentration dynamics over time and the frequency of reversion to seronegativity. Our results show that (i) anti-HEV IgG can rise even years after an already clearly measurable concentration of IgG of high avidity or may stay constant for relatively long periods of time. Overall, there is a general decrease after an observation period of at least 5 years becoming more distinct over time; (ii) only one of 45 subjects reverted to seronegativity after 9.7 years; and (iii) four of 45 subjects showed serologic signs of HEV reinfection.

Hogema et al.⁶ described a small and slow decline of anti-HEV IgG. Nine of 23 subjects (39%) lost more than 50% of their specific antibodies or reverted to seronegativity over an average period of 23.1 years. This is in accordance with our finding that anti-HEV IgG from 17 of 45 patients (38%) declines over an average time of 10.2 years.

In contrast, a rapid decline of anti-HEV IgG over time was observed in the long-term efficacy study of a hepatitis E vaccine described by Zhang and coworkers.¹³ One month after the receipt of the third dose, a mean concentration of 19.0 WU mL^{-1} was detected in the serum samples taken from participants who had an antibody increase of ≥ 4 -fold.¹⁴ The concentration steadily declined to 0.27 WU mL^{-1} after 4.5 years.¹³ Antibody concentration dynamics after natural infection are most probably different from the dynamics after vaccination. Therefore, cautious interpretation is warranted when comparing data from these two settings. Nevertheless, in our (nonvaccine) study, a less pronounced decline from 18.7 to 12.8 WU mL^{-1} was observed within

a geometric mean time of 4.6 years. This remarkable difference in humoral immune response is of particular interest when we consider that an anti-HEV IgG concentration <7 WU mL⁻¹ appears to be nonprotective against HEV reinfection in solid-organ transplant recipients.¹⁵ Moreover, a reinfection of a healthy subject with an anti-HEV IgG concentration of ~ 12 WU mL⁻¹ was observed.¹⁰

In our study, every follow-up sample contained anti-HEV IgG of 0.4–161.0 WU mL⁻¹. The individual course of four subjects indicated reinfections by a more than fourfold increase of a positive anti-HEV IgG of high avidity at baseline. Remarkably, the pre-existing anti-HEV IgG concentration was always <7 WU mL⁻¹ (range: 0.7–6.4). Moreover, one of those subjects had a serologic profile indicating four consecutive reinfections in intervals of 1.2–3.4 years. Every serum with an anti-HEV IgG increase of \geq fourfold was negative for anti-HEV IgM.

When applying the manufacturer's cut-off, only one subject reverted to seronegativity after 9.7 years. This low incidence of 2% stands in contrast to the hitherto observed higher rates of 22%⁶ and 50%.¹⁰ All subjects with reversion to seronegativity had low initial anti-HEV IgG concentrations in common.

Taking into account that in most cases HEV is acquired by oral ingestion, a putative mucosal protection is probably mediated by HEV-specific IgA antibodies. After mucosal infection, a protective mechanism could also be exerted by HEV-specific neutralizing IgG antibodies present in the blood. However, these mechanisms of putative humoral protection are not yet well understood. When considering the widespread presence of HEV in pork products, a repeated exposure may booster anti-HEV IgG levels in a large part of the seropositive subjects. However, our data indicate that these booster effects may not confer long-lasting immunity against reinfection.

When interpreting our results, some limitations have to be considered. First, we do not know how long after HEV infection the samples were taken. Second, information about medication or comorbidities of the study subjects was not available.

In summary, our study shows that anti-HEV IgG significantly decreases within a period of at least 5 years. However, the decrease is associated with a low rate of reversion to seronegativity. Serologic signs of HEV reinfection were found in 9% of all study subjects.

CONFLICTS OF INTEREST

None (all authors).

REFERENCES

- Smith DB, Simmonds P; International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study Group, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol*. 2014;95:2223–2232.
- Van der Poel WH. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Curr Opin Virol*. 2014;4:91–96.
- Li TC, Chijiwa K, Sera N, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1958–1960.
- Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, Jilg W. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol*. 2011;52:50–54.
- Faber MS, Wenzel JJ, Jilg W, Thamm M, Hohle M, Stark K. Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1654–1657.
- Hogema BM, Molier M, Slot E, Zaaier HL. Past and present of hepatitis E in the Netherlands. *Transfusion*. 2014;54:3092–3096.
- Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:2309–2312.
- Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, Banks M. Hepatitis E: An emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:698–709.
- Huang S, Zhang X, Jiang H, et al. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One*. 2010;5:e13560.
- Servant-Delmas A, Abravanel F, Lefrere JJ, et al. New insights into the natural history of hepatitis E virus infection through a longitudinal study of multitransfused immunocompetent patients in France. *J Viral Hepat*. 2016;23:569–575.
- Ferguson M, Walker D, Mast E, Fields H. Report of a collaborative study to assess the suitability of a reference reagent for antibodies to hepatitis E virus. *Biologicals*. 2002;30:43–48.
- Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Thuraiajah P, Dalton HR. Serological response to hepatitis E virus genotype 3 infection: IgG quantitation, avidity, and IgM response. *J Med Virol*. 2008;80:95–101.
- Zhang J, Shih JW, Xia NS. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. *N Engl J Med*. 2015;372:2265–2266.
- Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: A large-scale, randomized, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:895–902.
- Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, et al. Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients can evolve into chronic infections. *J Infect Dis*. 2014;209:1900–1906.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

Erklärung gemäß §6 Abschnitt 5 (2)

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Journal of Viral Hepatitis, Jahrgang 24, Ausgabe 1, Januar 2017, Seiten 75 – 79,
DOI 10.1111/jvh.12621

Danksagung

Vielen Dank, sehr geehrter Herr Professor Gessner, für die Möglichkeit, an Ihrem Institut zu promovieren.

Vielen Dank, sehr geehrte Frau Professorin Schmidt, für Ihre Unterstützung und Ihren Rat.

Vielen Dank, sehr geehrter Herr Professor Jilg. Sie begleiteten diese Arbeit von Anfang an. Ihre Erfahrung und Ihre wertvollen Ratschläge, Ideen und Verbesserungsvorschläge haben diese Dissertation sehr bereichert.

Vielen Dank, sehr geehrter Herr Privatdozent Werner, dass Sie sich bereit erklärt haben, diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Vielen Dank, lieber Jürgen, für deine jahrelange, geduldige Betreuung auf dem Weg zur Promotion. Danke, dass ich Teil deiner Arbeitsgruppe sein konnte und mit euch gemeinsam an diesen spannenden Themen arbeiten durfte. Danke, dass du diese Arbeit bis zum Schluss begleitet und bereichert hast.

Vielen Dank, lieber Mathias, für all deine Unterstützung und die gute Zusammenarbeit mit dir, die mir sehr viel Freude gemacht hat. Deine Hilfe war unverzichtbar. Wir sind dieses Projekt von Anfang an gemeinsam angegangen, waren ein tolles Team und natürlich die Arbeitsgruppe mit dem besten Kuchen.

Vielen Dank, liebe Monika, ohne dich wäre es in D2.4.74 nur halb so schön gewesen. Danke für alles, was du mir beigebracht hast. Danke für deine Hilfe, deine aufmunternden Worte und die schöne Zeit, die wir zusammen in der AG Wenzel verbringen konnten.

Vielen Dank, liebes Virologie-Team, dass ihr mich so herzlich aufgenommen habt und mir hilfreich zur Seite gestanden seid.

Vielen Dank, liebe Familie, dass ihr jederzeit mein Rückhalt seid, dass ihr mich begleitet und an mich glaubt.

Vielen Dank, lieber Flo, dass du für mich da warst und bist.

Eigene Veröffentlichungen

Schemmerer, M.*; **Rauh, C.***; Jilg, W.; Wenzel, J. J. (2017): Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults. In: *Journal of Viral Hepatitis* 24 (1), S. 75–79. DOI: 10.1111/jvh.12621.

Faber, M.; Willrich, N.; Schemmerer, M.; **Rauh, C.**; Kuhnert, R.; Stark, K.; Wenzel, J. J. (2018): Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. In: *Journal of viral hepatitis*. DOI: 10.1111/jvh.12868.

Rauh, C.; Dufour, J.-F. (2017): Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD). In: *Therapeutische Umschau. Revue Therapeutique* 74 (3), S. 87–92. DOI: 10.1024/0040-5930/a000890.