

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

**DIE ENTWICKLUNG DER HEPATITIS-E-VIRUS SEROPRÄVALENZ IN
SÜDDEUTSCHLAND VON 2003 BIS 2015**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Hannah Mahrt

2019

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

**DIE ENTWICKLUNG DER HEPATITIS-E-VIRUS SEROPRÄVALENZ IN
SÜDDEUTSCHLAND VON 2003 BIS 2015**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Hannah Mahrt

2019

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Wenzel

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Jens Werner

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juni 2020

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:

Mahrt, H., Schemmerer, M., Behrens, G., Leitzmann, M., Jilg, W. and Wenzel, J. J. (2018), Continuous decline of Hepatitis E Virus seroprevalence in southern Germany despite increasing notifications, 2003–2015. *Emerging Microbes & Infections*, 7: 133.

DOI: 10.1038/s41426-018-0136-8

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
1 Einleitung	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Material	8
2.1.1 Geräte	8
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	9
2.1.3 Chemikalien.....	10
2.1.4 Puffer	10
2.1.5 Kommerziell erhältlicher Kit.....	10
2.1.6 Computerprogramme.....	10
2.2 Methoden	11
2.2.1 Stichprobe und Studiendesign.....	11
2.2.2 Anti-Hepatitis E IgG Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	13
2.2.3 Pufferherstellung	14
2.2.4 Quantifizierung des qualitativen ELISA Testes durch Kalibration mit WHO Referenzserum.....	14
2.2.5 Statistische Datenauswertung.....	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Qualitative Ergebnisse	18
3.2 Quantitative Ergebnisse	19
3.3 Repräsentativität der Studie	19
3.3.1 Geschlechterverteilung in der Grundgesamtheit	20
3.3.2 Altersgruppenverteilung in der Grundgesamtheit	20
3.3.3 Postleitzahlen der Probeneinsender	20
3.3.4 Einsendende Fachrichtungen.....	21
3.4 Ergebnisvalidität	21

3.4.1	Begrenzung des potenziell quantifizierbaren Bereiches	21
3.4.2	Interassayvariabilität	21
4	Diskussion	24
5	Ausblick.....	31
6	Anhang	32
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	32
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	33
6.3	Tabellenverzeichnis	33
7	Literaturverzeichnis.....	34
	Originalpublikation	39
	Erklärung gemäß § 6 Absatz 5 Satz 2 Promotionsordnung	47
	Danksagung.....	48

Zusammenfassung

Infektionen mit dem Hepatitis-E-Virus (HEV) haben auch über Fachkreise hinaus in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen. In vielen europäischen Ländern – so auch in Deutschland – ist ein deutlicher Zuwachs an gemeldeten autochthonen Hepatitis E Fällen in den vergangenen Jahren zu verzeichnen. Es ist jedoch unklar, ob die Zunahme der Meldungen tatsächlich eine Zunahme der Infektionslast in der Bevölkerung widerspiegelt.

Vor diesem Hintergrund befasst sich die vorliegende Arbeit mit dem zeitlichen Verlauf der HEV-Seroprävalenz als Indikator der Infektionslast in Süddeutschland zwischen 2003 und 2015. Insgesamt 3000 Probandenseren wurden auf das Vorhandensein von Anti-HEV Immunglobulin G (IgG) untersucht. Diese waren gleichmäßig über die Jahre 2003, 2006, 2009, 2012 und 2015, zwei Altersgruppen (20–29 und 30–39 Jahre) sowie beide Geschlechter verteilt. Bei positiv getesteten Proben wurde zusätzlich die Antikörperkonzentration bestimmt. Es zeigte sich, dass die Seroprävalenz von 32,8 % im Jahr 2003 über 22,5 % im Jahr 2006 ($p < 0,001$) und 22,3 % im Jahr 2009 hin zu 17,7 % und 17,8 % in den Jahren 2012 und 2015 sank. Bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Probanden ($p = 0,018$) und bei 30- bis 39-Jährigen im Vergleich zu 20- bis 29-Jährigen ($p < 0,001$) konnte ein höheres Prävalenzniveau festgestellt werden. Insgesamt variierten die gemessenen Antikörperkonzentrationen zwischen 0,22 WU/ml¹ und 1783,19 WU/ml. In der Altersgruppe der 20- bis 29-Jährigen war die mediane Antikörperkonzentration mit 2,41 WU/ml signifikant höher als in der Altersgruppe der 30- bis 39-Jährigen, in welcher sie bei 1,89 WU/ml lag ($p < 0,001$).

Im Zeitraum von 2003 bis 2012 nahm die Anti-HEV IgG Seroprävalenz von 32,8 % bis auf einen Wert von circa 18 % ab, welcher auch für 2015 gemessen wurde. Die beobachtete Abnahme der Seroprävalenz spricht für einen in den letzten Jahrzehnten niedrigeren Infektionsdruck in der Bevölkerung Süddeutschlands. Eine solch niedrige Anti-HEV Prävalenz unter den jungen Erwachsenen deutet auf eine Population geringer spezifischer Immunität hin und kennzeichnet ein zukünftig potenziell höheres Infektionsrisiko bezüglich des Hepatitis E Erregers in dieser Altersgruppe. Folglich ist die Identifikation und Reduktion potenzieller HEV-Infektionsquellen, eine kontinuierliche Überwachung der epidemiologischen Situation und eine gewissenhafte HEV-Diagnostik bei Verdachtsfällen auch weiterhin indiziert.

¹ WU/ml: WHO Units pro ml; eine von der World Health Organization (WHO) mittels Referenzserum genormte Menge an Antikörpern pro Milliliter

1 Einleitung

Das im Jahr 1983 von dem russischen Wissenschaftler M. S. Balayan entdeckte Hepatitis-E-Virus (HEV) hat seit 2008 stetig an Aufmerksamkeit gewonnen. Obwohl bislang nur ein Serotyp des HEV bekannt ist, zeigt das Virus in seinen Genotypen und deren Epidemiologie deutliche Unterschiede (1). Während sich das Interesse zunächst auf die Genotypen 1 und 2 im Kontext von Trinkwasser-assoziierten Ausbrüchen in Entwicklungsländern bezog, kam man etwa nach 2008 zu der Erkenntnis, dass die für Nahrungsmittel-assoziierte zoonotische Infektionen verantwortlichen Genotypen 3 und 4 autochthon weltweit verbreitet sind (2). Auch häuften sich seit dieser Zeit Berichte über transfusionsbedingte Übertragungen des Erregers in verschiedenen Ländern (3,4). Betrachtet man die ansteigenden Zahlen an gemeldeten Fällen des Robert Koch-Institutes von 220 im Jahr 2010 (5) auf 1266 Fälle in 2015 (6) und die steigende Zahl an wissenschaftlichen Publikationen auf diesem Gebiet (7,8), so könnte man denken, das Virus habe sich in den industrialisierten Ländern, und somit auch in Deutschland, zunehmend ausgebreitet. Zusätzlich zu der bereits bekannten, mit einer akuten Hepatitis assoziierten Symptomatik, wie Ikterus und Pruritus, werden auch zunehmend neurologische Symptome und Symptomkomplexe, wie das Guillain-Barré-Syndrom (9) oder die seltene neuralgische Amyotrophie (10), mit dem Virus in Verbindung gebracht. Auch sind seit 2004 chronische Verläufe der Hepatitis E bei immunsupprimierten Patienten bekannt (11,12). Im Jahr 2014 führte die transfusionsbedingte Infektion mit dem fünften viralen Hepatitis-erregers zu einer drastischen Verschlechterung einer Graft-versus-Host-Erkrankung eines Patienten mit Mantelzell-Lymphom. Er verstarb letztendlich im fulminanten Leber- und Nierenversagen (13).

Zieht man jedoch ebenfalls in Betracht, dass mehr als 99 % der Infektionen mit dem Hepatitis-E-Virus asymptomatisch verlaufen und folgenlos ausheilen (8), so lässt sich die Diskrepanz zu einer seit 20 Jahren nicht ansteigenden Anti-HEV IgG Seroprävalenz (14) besser erklären. Auch eine vorausgegangene Studie der Arbeitsgruppe um Wenzel et al. kam zu dem Ergebnis, dass die Anti-HEV IgG Seroprävalenz in Süddeutschland keineswegs gestiegen, sondern im Gegenteil von 1996 bis 2011 deutlich von 50,7 % auf 34,3 % gesunken ist. Auch fiel eine höhere Prävalenz in den oberen Altersgruppen der 50- bis 79-Jährigen auf, welche auf ein kumulatives Lebenszeitrisiko für eine Infektion zurückgeführt wurde (15).

Dazu im Widerspruch stehende Daten veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Hogema et al., die in der Altersgruppe der 18- bis 21-Jährigen aus den Niederlanden einen Zuwachs der Anti-HEV

IgG Seroprävalenz von 2000 bis 2010 um ca. 7 % darstellen konnte (16,17). Auch finden sich derzeit auf ganz Europa bezogen viele unterschiedliche Angaben zu aktuellen Prävalenzen in den jeweiligen Ländern und Regionen (18). Die einzelnen Studien lassen sich jedoch aufgrund der deutlich verschiedenen Sensitivität der verwendeten Testsysteme (19) schwerlich miteinander vergleichen.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Entwicklung der infektionsepidemiologischen Situation bezüglich des Hepatitis-E-Virus besser zu verstehen. Hierzu wird zum einen die Entwicklung der Anti-HEV IgG Seroprävalenz in Süddeutschland in der jüngeren Vergangenheit untersucht und diese vor dem Hintergrund der steigenden Meldetfälle akuter Hepatitis-E-Virus Infektionen betrachtet. Zum anderen ermöglicht die Quantifizierung des verwendeten Testsystems eine Angabe der Anti-HEV IgG Antikörperkonzentration in standardisierten WHO Units/ml und damit eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen anderer Untersuchungen zur Entwicklung des Anteils der Anti-HEV IgG Positiven.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Brutschrank CO ₂	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
ELISA Reader infinite F50	TECAN	Grödig, Österreich
Eppendorf Multipette	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Multipette plus 5	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference 0,5–10 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 10–100 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Feinwaage MC 210 P	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr	Bulle, Schweiz
Gilson Pipetman P20	Gilson	Middelton, USA
Gilson Pipetman P20 Neo	Gilson	Middelton, USA
Gilson Pipetman P10	Gilson	Middelton, USA
Gilson Pipetman P10 Neo	Gilson	Middelton, USA
Gilson Pipetman P100	Gilson	Middelton, USA
Gilson Pipetman P100 Neo	Gilson	Middelton, USA
Hydro flex ELISA Washer	TECAN	Grödig, Österreich
Kühlgerät KU 1513, Type 100051	Liebherr	Bulle, Schweiz
Mini Zentrifuge Centrifuge 5417c	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences	Zizers, Schweiz
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Rotanta / RP	Hettich Lab Technology	Tuttlingen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
Dispensertips PDtips, 5,0 ml, unsteril, Typ codiert	BRAND Art. Nr.: 702376	Wertheim, Deutschland
Falcon 50 ml High Clarity, PP, Centrifuge Tube, Conical Bottom, steril	Corning Art. Nr.: 352070	Corning, NY, USA
Handschuhe Gentle skin grip	Meditrade Art. Nr.: 1221 GRIP S	Kiefersfelden, Deutschland
Mikroschraubröhre 2 ml, PP, flach, mit montiertem Verschluss, steril	Sarstedt Art. Nr.: 72.694.005	Nümbrecht, Deutschland
Pipette, 25 ml, Graduierung 2/10 ml, steril, Papier-Kunststoff Verpackung	greiner bio-one Art. Nr.: 760180	Kremsmünster, Österreich
Reagiergefäß 0,5 ml aus PP, mit anhängendem PP Stopfen, farblos	Sarstedt Art. Nr.: 72.699	Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 0,5 ml aus PP, mit anhängendem PP Stopfen, rot	Sarstedt Art. Nr.: 72.699.001	Nümbrecht, Deutschland
ritips®professional, 2,5 ml, unsteril	Ritter Art. Nr.: 40007 - 0005	Schwabmünchen, Deutschland
Rotilabo®-Cryoboxen aus Karton, weiß	Carl Roth GmbH + Co. KG Art. Nr.: CLE9.1	Karlsruhe, Deutschland
Safe Seal SurPhob Spitzen 10 µl, extra lang, steril	Biozym Art. Nr.: VT0200	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Safe Seal Tips Premium XL 200 µl, steril	Biozym Art. Nr.: 692159	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Vala ® Clean eco	Paul Hartmann GmbH Art. Nr.: 992341	Wiener Neudorf, Österreich

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Ort
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS ₀) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Lonza Katalognummer: 17-516F	Verviers, Belgien
Albumin aus Kälberserum (BSA) LOT: SLBF 1402V	Sigma-Aldrich Life Science Art. Nr.: A9418-50G	St. Louis, MO, USA
Incidin plus	ECOLAB	Saint Paul, MN, USA
WHO Referenzreagenz für Hepatitis-E- Virus Antikörper, Humanserum NIBSC code: 95/584	National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)	Ridge, Hertfordshire, UK

2.1.4 Puffer

Als Pufferlösung wurde 0,2 % BSA (w/v) in PBS₀ verwendet.

2.1.5 Kommerziell erhältlicher Kit

Zur Testung der Proben wurde das kommerziell erhältliche Kit Anti-HEV IgG ELISA (Art.-Nr.: WE – 7296, LOT Nummern EG20160301 und EG20160502) der Firma Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd. (Beijing, China) verwendet.

2.1.6 Computerprogramme

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Computerprogramme

Programm	Version	Hersteller	Ort
Citavi	5	Swiss Academic Software GmbH	Wädenswil, Schweiz
G*Power	3.1	Heinrich-Heine-Universität	Düsseldorf, Deutschland
HydroControl	4.1	Tecan Austria GmbH	Grödig, Österreich
Magellan for F50	7.0	Tecan Austria GmbH	Grödig, Österreich
Microsoft Excel	16.0.6741.2048	Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
Microsoft Word	16.0.6741.2048	Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA

R i386	3.0.2	The R Foundation for Statistical Computing	Wien, Österreich
Sigma Plot	12.3	Systat Software Inc.	Chicago, IL, USA
SPSS	23	IBM	Armonk, NY, USA
TrueCrypt	7.0	TrueCrypt Foundation	Nicht vorhanden
yEd Graph Editor	3.15.0.2	yWorks	Tübingen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Stichprobe und Studiendesign

2.2.1.1 Stichprobenkriterien

Die Grundgesamtheit der Stichprobenziehung stellten in der Biobank des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg aufbewahrte Proben dar, aus denen für die vorliegende Arbeit Stichproben aus den Jahren 2003, 2006, 2009, 2012 und 2015 gezogen wurden. Alle Proben wurden aus Überständen der täglichen Routine des Diagnostiklabors gewonnen und sind bis zur Testung bei -20 °C aufbewahrt worden. Die Auswahl der in die Untersuchung eingeschlossenen Proben erfolgte unter verschiedenen Gesichtspunkten:

In erster Linie wurden die Kriterien in Anlehnung an eine vorausgegangene Studie der Arbeitsgruppe Wenzel et al. (15) festgelegt, um die Vergleichbarkeit sicherzustellen. In jener Arbeit – und so auch in dieser – wurden Proben von Mitarbeitern des Universitätsklinikums Regensburg, d. h. Proben, die als Betriebsarzteinsendungen sowie als sog. „Nadelstichverletzungen“ eingesandt wurden, ausgeschlossen. Dies diente dazu, Personen mit berufsbedingt allgemein erhöhtem Infektionsrisiko nicht in die Prävalenzbetrachtung mit einzuschließen und damit eine für die einheimische Bevölkerung repräsentative Stichprobe zu erhalten. Des Weiteren wurden Mehrfacheinsendungen von ein und derselben Person ebenfalls ausgeschlossen, um eine Überrepräsentation zu vermeiden.

In zweiter Linie wurden in dieser Untersuchung nur die 20- bis 39-Jährigen betrachtet, da in dieser Altersgruppe die durchschnittliche Anti-HEV IgG Seroprävalenz noch relativ gering ist (15,19,20) und sich ein Wandel in der Prävalenzentwicklung hier am deutlichsten abzeichnen würde.

Nach dem Ausschluss der nach obigen Kriterien nicht in die Untersuchung einzuschließenden Proben erfolgte eine zufällige Ziehung in 2.2.1.4 näher beschriebener Vorgehensweise der zu testenden Proben.

2.2.1.2 Annahmen zur Prävalenzentwicklung

Als Ausgangswert für die Anti-HEV IgG Seroprävalenz der 20- bis 39-Jährigen in 2011 wurde der von Wenzel et al. 2014 veröffentlichte Wert von 13,45 % (Testung mittels ELISA des Herstellers Axiom Diagnostics) herangezogen (15). Die Annahmen zur weiteren Entwicklung der Prävalenzen fußten auf den Ergebnissen der Studie von Hogema et al. (16), wonach sich seit ca. dem Jahr 2000 ein jährlicher Anti-HEV IgG Seroprävalenzzuwachs von 0,5 % in der jüngsten betrachteten Altersgruppe in den Niederlanden abzeichnete.

Unter diesen Annahmen wurde ein Studiendesign entwickelt, welches einen erwarteten Prävalenzanstieg von 2003 bis 2015 um 6 % anhand einer realistisch zu bearbeitenden Stichprobengröße statistisch signifikant ($\alpha = 0,05$, Power 95 %) belegen kann.

2.2.1.3 Studiendesign und Powerberechnung mit G*Power

Zur Berechnung der statistischen Parameter des Studiendesigns, wie Power P, Stichprobengröße N und nachweisbarer Effekt p, wurde mit dem Programm G*Power gearbeitet (21). Den Berechnungen wurden die oben beschriebenen Annahmen zur Prävalenzentwicklung sowie eine statistische Power von mindestens 80 % und ein Signifikanzniveau von 5 % zugrunde gelegt.

Als Gesamtstichprobengröße wurde nach obigen Parametern gemäß Abb. 1 ein Probenumfang von 3000 Proben gewählt. Diese wurden gleichmäßig auf Ziehungsjahr, Altersgruppe und Geschlecht aufgeteilt, sodass auch zwischen den einzelnen Untergruppen mit einer jeweiligen Kollektivgröße von 150 Proben eine statistische Datenauswertung mit $\alpha = 0,05$ und einer statistischen Power von 93,4 % möglich ist.

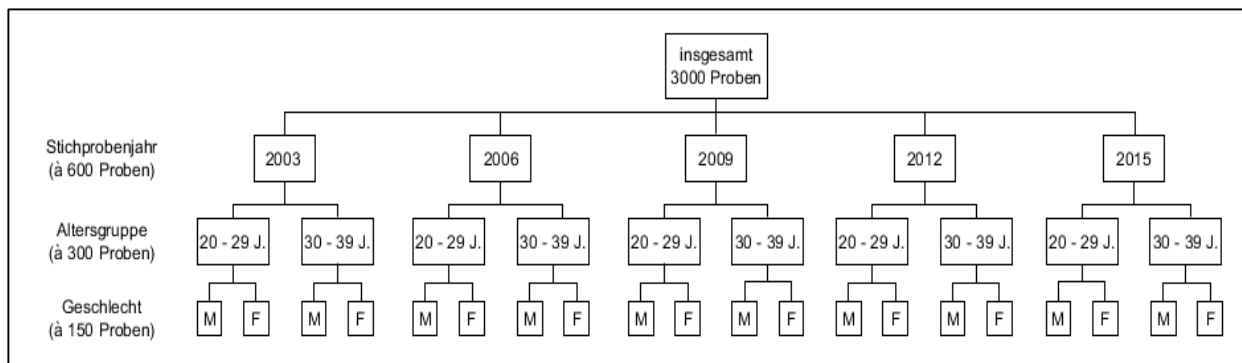


Abbildung 1: Studiendesign (M: Männer, F: Frauen): Die 3000 Proben wurden symmetrisch auf Ziehungsjahr, Altersgruppe und Geschlecht aufgeteilt, sodass je Untergruppe (z.B. 2006/20-29 J./M) 150 Proben zur Testung zur Verfügung stehen.

2.2.1.4 Stichprobenziehung

Die Ziehung der Stichproben aus den nach Anwendung obiger Kriterien noch zur Verfügung stehenden 15.082 Proben erfolgte mittels des Computerprogramms R i386. In jeder Ziehungsguppe sollten insgesamt 150 Proben zur Testung zur Verfügung stehen. Da davon auszugehen war, dass sich ca. 20 % der in der Datenbank gelisteten Proben aufgrund zeitgleich durchgeführter anderer Projekte oder Verbrauch der Proben in der Vergangenheit nicht in der Biobank auffinden lassen, wurden pro Ziehungsguppe bereits zu Beginn 200 Proben zufällig ausgewählt.

Die Daten wurden in Form von nach Jahr, Altersgruppe und Geschlecht geordneten Probennummern zur Vorbereitung für R in einzelne txt-Dateien gespeichert. Der verwendete Algorithmus zur Ziehung einer zufälligen Stichprobe mit R lautete wie folgt:

- Import der Daten:


```
> VTabelle=read.table("[Jahr_Altersgruppe_Geschlecht].txt")
```
- Spalte V1 von VTabelle in einen Vektor wandeln:


```
> VVektor <- VTabelle[, "V1"]
```
- Zufallsstichprobe von 200 Probennummern ohne Zurücklegen mittels der sample() Funktion ziehen:


```
> VSample <- sample(VVektor, 200, replace=F)
```
- Speichern der gezogenen Probennummern als .csv Datei:


```
> write.csv(VSample, file = "[Jahr_Altersgruppe_Geschlecht].csv")
```

2.2.2 Anti-Hepatitis E IgG Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Anti-HEV IgG Testungen wurden mittels ELISA durchgeführt. Hierzu wurde das kommerziell erhältliche Kit von Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd.

(Beijing, China) verwendet. Die Testdurchführung und qualitative Auswertung erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Die Waschschriffe wurden durch den ELISA Washer HydroFlex (TECAN Austria) ausgeführt. Die Extinktionen der Proben wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und anschließend der Betrag der Extinktion bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm subtrahiert, was der Messungskorrektur mittels eines Leerwertes entspricht. Bei der Testauswertung wurden Proben mit einem Verhältnis von optischer Dichte zu Cut-off (OD/CO) größer oder gleich 1 in der Einfachbestimmung als positiv gewertet, Proben mit kleinerem Verhältnis (OD/CO) als negativ.

2.2.3 Pufferherstellung

Zur Herstellung eines 0,2 % BSA in PBS_o Puffers wurden n mg BSA in $0,5 \times n$ ml PBS_o gelöst. (Bsp.: 20 mg BSA + 10 ml PBS_o)

2.2.4 Quantifizierung des qualitativen ELISA Testes durch Kalibration mit WHO Referenzserum

2.2.4.1 Aliquotieren des WHO Referenzserums

Das WHO Referenzserum für HEV-Antikörper (NIBSC Code: 95/584) wurde als biologischer Standard verwendet, um die genaue HEV-IgG Konzentration in World Health Organization Units (WU) zu bestimmen.

Die Rekonstitution wurde nach den Angaben des Datenblattes der NIBSC durchgeführt:

- Aufbrechen der Glasampulle
- Rekonstituieren des Pulvers in 0,5 ml sterilem, destilliertem Wasser

Die entstandene Lösung hat eine Anti-HEV IgG Konzentration $c_{ak} = 100$ WU/ml.

2.2.4.2 Erstellen der chargenspezifischen Kalibrationskurven

Als Ausgangsmaterial wurden 50 μ l des WHO Referenzserums der Konzentration $c_{ak} = 100$ WU/ml verwendet. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe mit 20 Verdünnungsstufen angefertigt. In jedem Verdünnungsschritt wurde im Verhältnis 1:2 auf ein Endvolumen von 25 μ l verdünnt. Jede dieser Verdünnungsstufen wurde im Duplikat auf eine Mikrotiterplatte des HEV IgG Kits aufgetragen und der ELISA durchgeführt.

Die Auswertung der photometrisch bestimmten Differenzdaten (Referenzmessung bei 620 nm subtrahiert von der optischen Dichte OD) bzw. OD dividiert durch den Cut-off Werte (OD/CO-Werte) erfolgte in SigmaPlot. Die OD/CO-Datenpaare der Duplikate wurden gemittelt und die Mittelwerte dann als Scatterplot gemäß Abb. 2 aufgetragen.

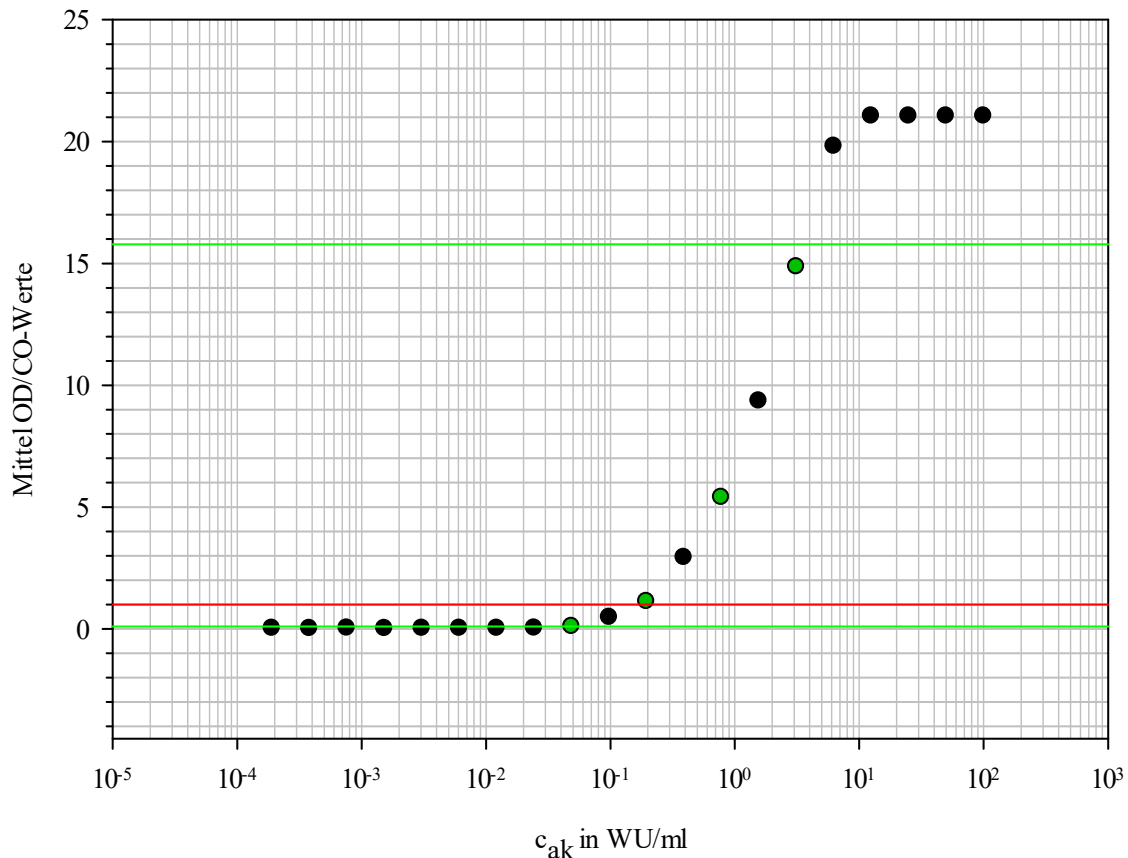


Abbildung 2: Exemplarisch ist der Verlauf der gemittelten Quotienten aus Kalibrationsmesswerten (OD) und Cut-off der Charge 1 gezeigt. Die Skalierung der x-Achse wurde logarithmisch gewählt, um auch die Messwerte im Bereich der höheren Verdünnungsfaktoren übersichtlich darstellen zu können. Die grünen Linien begrenzen den potenziell quantifizierbaren Bereich. In rot ist der Cut-off-Wert des Herstellers eingezeichnet, oberhalb dessen Proben als positiv gelten. Die grün eingefärbten Messpunkte dienen im weiteren Studienverlauf als feste Standardkalibrationspunkte.

Der potentiell quantifizierbare Bereich des angewandten ELISAs wurde wie folgt eingegrenzt:

Die obere Grenze des Bereiches wurde auf Grund der biotechnischen Eigenschaften des zur Auswertung genutzten Photometers bei einer OD der zu messenden Probe von 3 (entspricht einem OD/CO-Wert von 15,79) gewählt. Bei Proben mit einer höheren OD kommt es zu größeren Messungenauigkeiten, was eine Quantifizierbarkeit dieser Proben zunächst ausschließt. Zur Quantifizierung von Proben mit $OD > 3$ ist eine vorherige Verdünnung und Retestung notwendig. Die untere Grenze des Bereiches wurde an den Punkt der beginnenden Steigungszunahme des Verlaufes der Messpunkte bei einem OD/CO Wert von 0,032 gesetzt. Dies ergibt sich aus der Annahme, dass die genaueste Quantifizierung bei Proben innerhalb des

OD-Bereiches möglich ist, innerhalb dessen eine möglichst kleine Änderung der Konzentration c_{ak} eine möglichst große Änderung der OD zufolge hat, nämlich demjenigen Bereich des Messpunkteverlaufes mit der größten Steigung. Die so entstandene untere Grenze des potentiell quantifizierbaren Bereiches bleibt jedoch theoretisch, da sie unterhalb des Cut-off-Wertes liegt, welcher der minimalen optischen Dichte entspricht, ab welcher die Proben als positiv getestet definiert sind. Proben einer geringeren OD wurden als negativ definiert und daher nicht quantifiziert. Somit ergibt sich als praktische untere Grenze des quantifizierbaren Bereiches ein OD/CO-Wert von 1,0, welcher in der Grafik als rote Linie gekennzeichnet ist.

Die Möglichkeit, einer gemessenen OD bzw. OD-Differenz eine definierte Anti-HEV IgG Konzentration c_{ak} zuzuordnen, soll im Folgenden als Quantifizierung bezeichnet werden. Um bei allen durchgeführten ELISAs die Quantifizierung zu ermöglichen, wurden innerhalb des in Abbildung 2 durch die beiden grünen Linien eingegrenzten Bereiches vier Verdünnungs- bzw. Konzentrationsstufen gewählt, die den Bereich möglichst vollständig abbilden können (c_{ak} in WU/ml: 3,13; 0,78; 0,20 und 0,05). Anhand dieser vier gewählten Standard-Kalibrationspunkte konnte im Folgenden jede der als positiv getesteten Proben in den durchgeführten Testläufen quantifiziert werden. Zusätzlich ermöglicht das Auftragen der vier standardisierten Kalibrationspunkte ein nachträgliches rechnerisches Ausgleichen von Interassayvariabilitäten.

In Charge 2 verhielten sich die Messwerte der angefertigten Kalibrationskurve vergleichbar und es wurden die in Charge 1 gewählten Standardkalibrationspunkte beibehalten.

2.2.4.3 Anfertigen der Aliquote zur Aufbewahrung des WHO Referenzserums

Das Referenzserum sollte möglichst so gelagert werden, dass die Anti-HEV IgG Antikörper über die Dauer der Aufbewahrung stabil bleiben und sich damit die standardisierten Konzentrationen der Kalibrationspunkte nicht verändern. Hierzu wurde das nach Anfertigung der Kalibrationskurve noch vorhandene Referenzserum wie folgt aufgeteilt:

- 4 mal 25 μ l der Konzentration $c_{ak} = 100$ WU/ml: Entnahme von 4×25 μ l des WHO Referenzserums zu je 100 WU/ml und Einfüllen in rote 0,5 ml Reagiergefäße (Beschriftung: 100 WU/ml)

Als Ausgangsaliquot zur Anfertigung der vier Standard-Kalibrationspunkte wurde eine Konzentration von 12,5 WU/ml festgelegt:

- 117 mal 25 μ l der Konzentration $c_{ak} = 12,5$ WU/ml:
 - Verdünnen von 325 μ l des rekonstituierten WHO Referenzserums ($c_{ak} = 100$ WU/ml) mit 2275 μ l 0,2 % BSA (w/v) in PBS_o
 - Abfüllen von je 25 μ l in transparente 0,5 ml Reagiergefäße (Beschriftung: 12,5 WU/ml)

Die Aliquote wurden bei einer Temperatur von -80 °C aufbewahrt.

2.2.4.4 Quantifizierung der einzelnen ELISA-Läufe

Zunächst wurden die vier Verdünnungsstufen des WHO Referenzserums angefertigt. Das Ausgangsaliquot mit $c_{ak} = 12,5$ WU/ml wird in einer Verdünnungsreihe mit vier Stufen jeweils im Verhältnis 1:4 verdünnt, wobei das Endvolumen je 75 μ l beträgt.

Die erhaltenen Messwerte der vier Kalibrationspunkte bzw. die OD/CO-Werte wurden für jeden Lauf einzeln in einem Scatterplot aufgetragen und mittels Regression durch eine lineare Funktion $f(x) = y_0 + ax$ beschrieben. Anschließend konnten alle im quantifizierbaren Bereich gelegenen Messwerte der Proben in eine Anti-HEV IgG Konzentration c_{ak} umgerechnet werden. Zur Ergebnisinterpretation wurde nur den als positiv gewerteten Proben ($OD/CO \geq 1$) ein quantitativer Konzentrationswert zugeordnet und dieser ausgewertet.

2.2.5 Statistische Datenauswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit IBM SPSS Statistics 23 (IBM Armonk, USA) durchgeführt. Für die statistische Analyse der quantitativen Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, für die Analyse der qualitativen Daten der Chi-Quadrat Test mit Kontinuitätskorrektur. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ bewertet. Die Konfidenzintervalle von 95 % wurden anhand des Wilson Score Intervalls bestimmt.

Statistische Regressionsanalysen wurden mit R (R Foundation for Statistical Computing) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Qualitative Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen eine zeitabhängige Abnahme der Anti-HEV IgG Prävalenz in der untersuchten Population. Dieser Trend begann mit 32,8 % (2003) über 22,5 % (2006) und 22,3 % (2009) und endete bei 17,7 % (2012) und blieb konstant bei 17,8 % im Jahr 2015. Insgesamt konnte eine statistisch signifikante ($p < 0,001$) Abnahme um 15,0 % beobachtet werden beim Vergleich der Jahre 2003 und 2015.

Bei einer Analyse der Probenjahre nach Alter oder Geschlecht konnte beobachtet werden, dass die Prävalenz in diesen Gruppen die beobachtete insgesamt Abnahme der Prävalenz widerspiegelt. Bei einem Vergleich der Studienjahre 2003 und 2015, stellte sich die Abnahme für Männer ($p = 0,001$), Frauen ($p < 0,001$), 20- bis 29-Jährige ($p = 0,03$) und 30- bis 39-Jährige ($p < 0,001$) als statistisch signifikant dar. Der geringe Zuwachs der Prävalenz bei Männern sowie in den Altersgruppen der 20- bis 29-Jährigen in den Jahren zwischen 2012 und 2015 war nicht statistisch signifikant ($p = 0,836$ und $p = 0,487$).

Abgesehen von Veränderungen im zeitlichen Verlauf zeigte sich die Anti-HEV IgG Seroprävalenz deutlich höher für männliche Testpersonen als in der weiblichen Population in den Jahren 2006 und 2009 ($p < 0,05$). In den verbleibenden Jahren konnte kein signifikanter Unterschied in der Prävalenz zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt werden. Zwischen den Jahren 2003 und 2012 konnten statistisch signifikant höhere Prävalenzen für Personen im Alter zwischen 30 und 39 Jahren festgestellt werden als für die jüngere Studienpopulation (2003: $p < 0,001$; 2006 borderline: $p = 0,051$; 2009: $p = 0,002$; 2012: $p = 0,007$). Indessen stellte sich im Jahr 2015 kein signifikanter Unterschied der Prävalenz in den unterschiedlichen Altersgruppen dar.

Bei der statistischen Auswertung zusätzlicher Untergruppen (z. B. Proben aus einem Ziehungsjahr weiter unterteilt in geschlechtsspezifische Altersgruppen; $n = 150$) zeigte sich der deutlichste Unterschied in der Prävalenz zwischen Frauen zwischen 20 und 29 Jahren und Männern zwischen 30 und 39 Jahren: 2003 (23,3 % vs. 40,0 %, $p = 0,003$), 2006 (14,7 % vs. 29,3 %, $p = 0,003$), 2009 (15,3 % vs. 34,0 %, $p < 0,001$) und 2012 (11,3 % vs. 22,0 %, $p = 0,02$). Ebenfalls eine höhere Prävalenz wurde bei Frauen zwischen 30 und 39 Jahren im Vergleich zu

Frauen zwischen 20 und 29 Jahren im Jahr 2003 ($p < 0,001$) und 2012 ($p = 0,02$) festgestellt. Die Prävalenz anderer Untergruppen unterschieden sich lediglich geringfügig.

Bei der alleinigen Betrachtung geschlechts- und altersspezifischer Untergruppen, unabhängig vom Studienjahr, zeigt sich die männliche Studienpopulation signifikant öfter positiv für Anti-HEV IgG als die weibliche (24,5 % vs. 20,8 %, $p = 0,018$). Eine vergleichbare Beobachtung konnte für die 30- bis 39-jährigen im Vergleich zu den 20- bis 29-jährigen gemacht werden (27,7 % vs. 17,6 %, $p < 0,001$).

3.2 Quantitative Ergebnisse

Die absolute Antikörperkonzentration der Anti-HEV IgG wurde in allen als positiv getesteten Proben ($OD/CO \geq 1$) bestimmt. Die Konzentration variierte zwischen 0,22 und 178,05 WU/ml, mit der Ausnahme einer positiven Probe, welche eine ausnehmend hohe Antikörperkonzentration von 1783,19 WU/ml aufwies. Diese trat bei einer 30- bis 39-jährigen Frau getestet im Jahr 2012 auf.

Sowohl in einer graphischen Darstellung der Antikörperkonzentrationen als Box-and-Whisker Diagramme der einzelnen Stichprobenjahre als auch in einem graphisch dargestellten linearen Regressionsmodell der Mediane der Konzentrationsmesswerte der jeweiligen Studienjahre (1,96; 1,99; 2,14; 2,24 und 2,25 WU/ml) zeigt sich ein Zuwachs der Konzentrationen über die Zeit. Allerdings zeigen beide Modelle lediglich einen geringfügigen jährlichen Anstieg der Mediane der Anti-HEV IgG Konzentration um ca. 0,03 WU/ml.

Die Auswertung der gruppenspezifischen Anti-HEV IgG-Konzentrationen erbrachte die Erkenntnis, dass das Geschlecht unabhängig vom Stichprobenjahr keinen Einfluss auf das durchschnittliche Antikörperkonzentrationsniveau hatte. In Zahlen bedeutet dies einen medianen Wert für Männer von 2,14 WU/ml verglichen mit dem Wert von 2,06 WU/ml für Frauen. Bei der Betrachtung der Altersgruppen fiel eine im Median signifikant höhere Anti-HEV IgG Konzentration der 20- bis 29-jährigen im Vergleich zu den 30- bis 39-jährigen auf (2,41 vs. 1,89 WU/ml, $p < 0,001$).

3.3 Repräsentativität der Studie

Um zu überprüfen, in wie weit aus den gewonnenen Daten Rückschlüsse auf die Prävalenzen der einheimischen Bevölkerung gezogen werden dürfen, wurde ebenfalls die Grundgesamtheit der

zur Verfügung stehenden Proben analysiert. Betrachtet wurde die Verteilung von Altersgruppen, Geschlecht und Herkunft der Probe (hierfür die Postleitzahl der Einsender).

3.3.1 Geschlechterverteilung in der Grundgesamtheit

Die Verteilung der weiblichen und männlichen Proben zeigte sich über die Stichprobenjahre hinweg ausgewogen. So waren im Jahr 2003 43,08 % männlichen, 56,92 % weiblichen Ursprungs, 2006 51,31 % männlich und 48,69 % weiblich, 2009 54,07 % männlich und 45,93 % weiblich, 2012 54,58 % männlich und 45,42 % weiblich sowie im Jahr 2015 52,20 % männlich und 47,80 % weiblich.

3.3.2 Altersgruppenverteilung in der Grundgesamtheit

Die Anteile der Altersgruppen an der Grundgesamtheit zeigten sich über die Ziehungsjahre hinweg konstant gleichmäßig verteilt. So lag der Anteil der 20- bis 29-Jährigen in den Jahren 2003, 2006, 2009, 2012 und 2015 bei 47,81 %, 50,51 %, 48,30 %, 52,60 % und 48,24 %. Der Anteil der 30- bis 39-Jährigen entsprechend bei 52,19 %, 49,49 %, 51,70 %, 47,40 % und 51,76 %.

3.3.3 Postleitzahlen der Probeneinsender

Um die Herkunft der Proben genauer zu betrachten wurden die Leitregionen der Postleitzahlen der Einsender untersucht. Den größten Anteil mit stets > 93 % machte in allen Jahren die Leitregion 93 aus, welche für die Gebiete Regensburg, Cham, Kelheim und Abensberg codiert. Der exakte Anteil der Leitregion 93, sowie die zweit- und dritthäufigste Leitregion der jeweiligen Ziehungsjahre sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Verteilung der Leitregionen der Postleitzahlen der Einsender

Codierte Gebiete der Leitregionen: 04: Leipzig, Altenburg, Eilenburg, Torgau; 15: Frankfurt (Oder), Eisenhüttenstadt, Fürstenwalde/Spree, Königs Wusterhausen; 17: Neubrandenburg, Greifswald, Neustrelitz, Usedom; 18: Rostock, Stralsund, Güstrow, Bergen auf Rügen; 22: Hamburg, Norderstedt, Ahrensburg, Wedel; 23: Lübeck, Bad Segeberg, Wismar, Mölln; 30: Hannover, Garbsen, Langenhagen, Laatzen; 69: Heidelberg, Weinheim, Leimen, Mannheim; 76: Karlsruhe, Baden-Baden, Landau in der Pfalz, Bruchsal

	2003	2006	2009	2012	2015
Leitregion 93	96,95 %	96,97 %	95,49 %	95,07 %	93,51 %
zweithäufigste Leitregion (Anteil)	22 (0,69 %)	15 (0,67 %)	17 (0,95 %)	23 (0,78 %)	04 (2,35 %)
dritthäufigste Leitregion (Anteil)	76 (0,44 %)	69 (0,47 %)	18 (0,55 %)	30 (0,52 %)	17 (1,36 %)

3.3.4 Einsendende Fachrichtungen

Um sicher zu gehen, dass sich die Fachrichtungen der einsendenden Stellen unseres Labors über den betrachteten Zeitraum hinweg nicht wesentlich geändert haben, ordneten wir jeder Probe eine Kategorie entsprechend der medizinischen Fachrichtung des Einsenders zu. Hierbei konnte im zeitlichen Verlauf keine wesentliche Veränderung der Anteile der verschiedenen Fachrichtungen an der Gesamtheit festgestellt werden.

3.4 Ergebnisvalidität

3.4.1 Begrenzung des potenziell quantifizierbaren Bereiches

Nach dem Abschluss aller Messungen wurde die untere Grenze des quantifizierbaren Bereiches auf den Wert des vom Hersteller angegebenen Cut-offs ($OD/CO = 1,0$) gelegt. Diese Eingrenzung hat zur Folge, dass nur als positiv geltende Proben quantifiziert wurden. Dies ist insofern gut vertretbar, als der Hersteller den Cut-off in einer Größenordnung der OD wählt, in welcher er die Farbreaktion der Proben als spezifisch genug erachtet, um einem tatsächlichen Vorhandensein von Anti-HEV IgG zugeschrieben werden zu können und nicht durch andere unspezifische Reaktionen hervorgerufen worden zu sein.

3.4.2 Interassayvariabilität

Durch das Mitführen des WHO-Standards in den definierten vier Verdünnungsstufen, war es möglich die Messwertschwankungen zwischen den einzelnen Läufen darzustellen. Diese sind auf geringfügige Änderungen der Versuchsbedingungen, wie Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit und unwesentliche Abweichungen in der Inkubationszeit der einzelnen

Platten, aber auch auf eventuelle Unterschiede in der Güte der Antigenbeschichtung der einzelnen Reaktionsvertiefungen zurückzuführen. Diese Messwertschwankungen sind insgesamt sehr gering und in sich konsistent, d. h. bei Läufen mit niedrigerer Signalstärke gilt dies für alle vier Kalibrationspunkte in gleicher Weise. In der Gesamtheit der mitgeführten Kalibrationspunkte zeigt sich gemäß Abb. 3 in allen vier Verdünnungsstufen ein geringer IQR und ein mittig gelegener Median, was auf keine übermäßige Streuung der Messwerte hinweist.

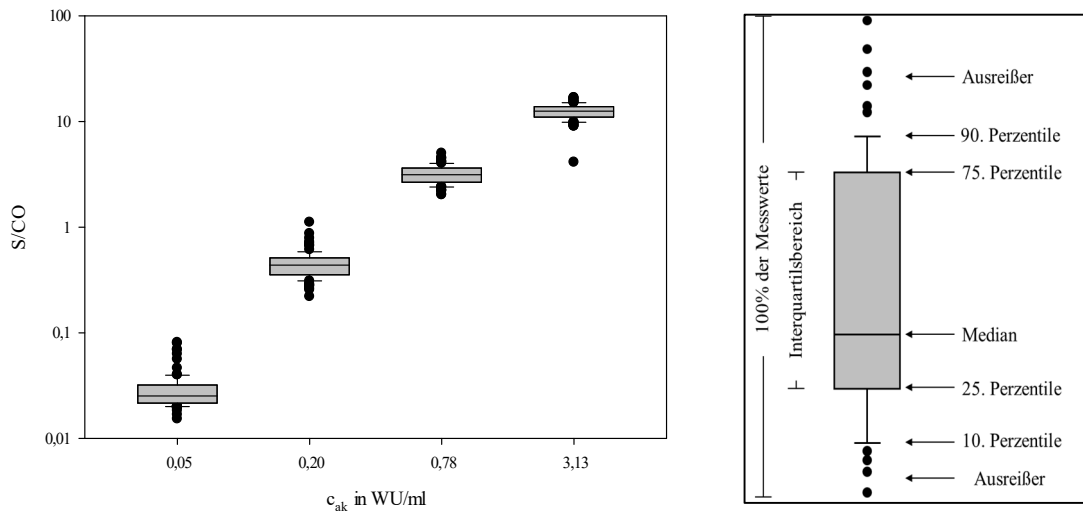


Abbildung 3: Box and Whisker Plots der vier Kalibrationspunkte.

Legende

Auch im zeitlichen Verlauf der durchgeführten Testungen zeigen sich nach Abb. 4 keine wesentlichen Veränderungen in den gemessenen optischen Dichten der vier Referenzpunkte. Dies lässt darauf schließen, dass die Konzentration ($c_{ak} = 12,5$ WU/ml) in den bei -80 °C aufbewahrten Aliquoten des WHO Referenzserums stabil geblieben ist. Auch in den zwei mit Charge 2 durchgeführten Testungen (EIA 91 und EIA 92) lässt sich keine wesentliche Abweichung der Messwerte feststellen.

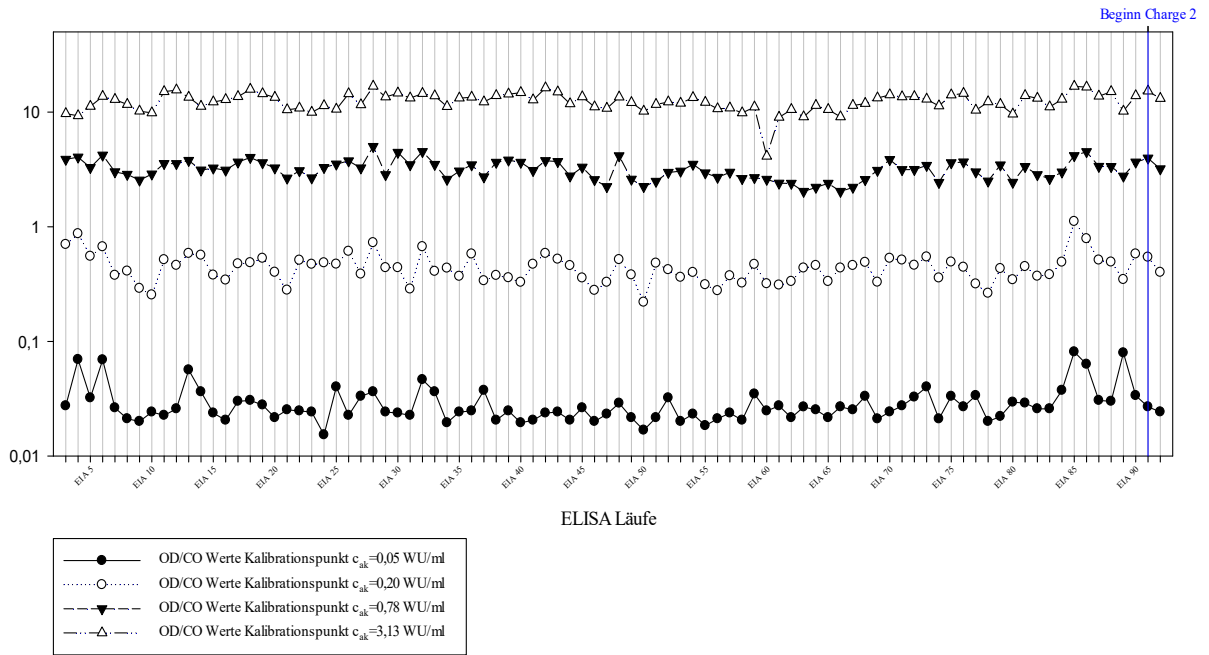


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der OD/CO Werte der standardisierten Kalibrationspunkte. In blau eingezeichnet ist der Beginn der mit Charge 2 durchgeführten Testungen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung der Anti-HEV IgG Prävalenz und Konzentration bei Erwachsenen zwischen 20–39 Jahren in den Jahren zwischen 2003 und 2015 in Süddeutschland untersucht. Die Ergebnisse zeigen (i) eine signifikante Abnahme der Anti-HEV IgG positiven jungen Erwachsenen, unter denen männliche und ältere Personen die höchste Prävalenz aufweisen.

Bei der quantitativen Betrachtung fällt auf, dass (ii) die Konzentrationen der HEV IgG Antikörper im jährlichen Median um 0,03 WU/ml ansteigen. Ebenso bemerkenswert ist, dass jüngere Personen höhere Antikörperkonzentrationen aufweisen als ältere Individuen. Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Antikörperkonzentrationen konnten nicht festgestellt werden.

In einer vorausgegangenen Studie wurde eine Abnahme der HEV-Antikörper Prävalenz von 20,5 % im Jahr 1996 auf 14,5 % im Jahr 2011 mittels einer Immunoblottestung in der gleichen Region Süddeutschlands festgestellt (15). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde über ähnliche Entwicklungen in Gesamtdeutschland mit einer Prävalenz von 18,6 % im Jahr 1998 und 15,3 % im Jahr 2010 (22) berichtet. Daher scheint es nahe liegend zu sein, dass auch die Ergebnisse dieser Arbeit auf ganz Deutschland übertragbar sind. Jedoch ist hier Vorsicht geboten, da die Untersuchung nicht dazu entworfen wurde, um die Situation des gesamten Landes zu untersuchen; außerdem wurde sich auf die Gruppe der jungen Erwachsenen zwischen 20 und 39 Jahren fokussiert. Die Vergleichbarkeit zwischen den Studien ist ebenfalls begrenzt, da die vorangegangenen Studien Personen im Alter zwischen 18 und 80 Jahren einschlossen. Des Weiteren ist es denkbar, dass manche geographische Regionen nicht den beobachteten kontinuierlichen Rückgang der HEV Prävalenz aufweisen, was womöglich regionalen oder ernährungsbedingten Faktoren geschuldet ist, wie es in Frankreich beobachtet wurde (23).

In Dänemark wurde ein vergleichbarer Rückgang der Anti-HEV IgG Prävalenz beobachtet (24). Mittels eines hausinternen Assays wurden Prävalenzen von 32,9 % im Jahr 1983, 20,6 % im Jahr 2003 und 10,7 % im Jahre 2013 ermittelt. Um besser vergleichbare Daten zu erhalten, wurden die im Jahr 2013 getesteten Proben erneut mit dem Wantai Assay getestet, welcher ebenfalls in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurde. Die Prävalenzrate, welche durch die Testung mittels des Wantai Assays festgestellt wurde, betrug 19,8 %, wobei alle Proben ebenfalls als positiv getestet wurden, welche bereits durch den hausinternen Assay als positiv

identifiziert wurden. Auch wenn die absoluten Zahlen nur schwerlich mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar sind, kann jedoch eine ähnliche Entwicklung über die Zeit festgehalten werden (24). Ebenfalls durch Testung mit dem Wantai Assay konnte in den USA eine vergleichbare Prävalenzrate sowie eine zeitliche Abnahme der Prävalenz festgestellt werden: 21,8 % im Jahr 2006 und 16,0 % im Jahr 2012 (25).

Die höheren Prävalenzen in den oberen Altersgruppen lassen sich durch das kumulative Infektionsrisiko mit zunehmendem Lebensalter erklären. Dieses Phänomen konnte durchweg in mehreren Studien für verschiedene geographische Regionen festgestellt werden (15,22,24,25).

Überraschenderweise waren in dieser Untersuchung signifikant mehr Männer HEV IgG positiv als Frauen. Im Gegensatz hierzu konnte in anderen Seroprävalenzstudien keine Korrelation zwischen Anti-HEV IgG Positivität und dem Geschlecht festgestellt werden (15,22,24,25). Nach derzeitigem Wissen wurde in der vorliegenden Untersuchung erstmals ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den geschlechtsspezifischen Anti-HEV IgG Prävalenzen beobachtet. Unter den vielen verschiedenen Faktoren, welche zu einer höheren Anti-HEV IgG Prävalenz bei männlichen Testpersonen geführt haben könnten, wird angenommen, dass Männer häufiger bestimmten Hobbys oder Berufen nachgehen, welche ein erhöhtes HEV Infektionsrisiko bergen. Diese wären zum Beispiel die Jagd oder die Arbeit als Veterinärmediziner (26,27). Ebenfalls ist der Fleischkonsum des männlichen Bevölkerungsanteils in Deutschland deutlich höher (28), was als die wichtigste Infektionsquelle für das HE Virus in den industrialisierten Nationen angesehen wird (29).

Zur Anti-HEV IgG Prävalenzentwicklung in den Niederlanden wurde berichtet, dass es zu einer statistisch signifikanten Zunahme ($p = 0,016$) unter den jungen Erwachsenen gekommen sei. So sei diese von 4,3 % (5/116) im Jahr 2000 auf 12,7 % (23/181) im Jahr 2011 angewachsen (16). Solch eine Entwicklung konnte für Süddeutschland anhand der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da sowohl vergleichbare Zeitspannen als auch Studienpopulation untersucht wurden. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied stellt die geographische Variabilität der Anti-HEV IgG Prävalenzen zwischen verschiedenen europäischen Ländern oder sogar innerhalb kleinerer geographischer Regionen dar (18,23,30).

Andere Autoren sehen die Unterschiede zwischen verschiedenen Testsystemen als ursächlich für nicht vergleichbare und stark variierende HEV Prävalenzdaten innerhalb Europas an

(18,30,31). In einer vorausgegangenen Studie wurde ebenfalls beobachtet, wie Unterschiede der analytischen Sensitivität eines weit verbreiteten Enzym-linked immunosorbent Essays (ELISA) verglichen mit einem Immunoblot unterschiedliche Seroprävalenzraten ergaben. So wurde für Probanden im Alter zwischen 20 und 79 Jahren im Jahr 2011 eine Prävalenzrate von 34,3 % HEV IgG Positiven unter Verwendung des ELISA Testsystems und von 14,5 % mittels Immunoblottestung gefunden (15). Jedoch sollte ein solcher Unterschied der Testcharakteristika nicht das Verhältnis zwischen verschiedenen Gruppen, welche zu verschiedenen Zeitpunkten mit demselben Testsystem getestet wurden, beeinflussen. Dennoch wurde in der vorliegenden Untersuchung das weit verbreitete und hochsensitive Wantai ELISA Testsystem verwendet, welches zusätzlich durch die Verwendung des WHO Referenzserums kalibriert wurde (32).

Durch die quantitative Analyse offenbarte sich ein stetiger Zuwachs der Anti-HEV IgG Antikörperkonzentration mit der Zeit. Obwohl der jährliche Gesamtzuwachs von 0,03 WU/ml (1,59 % des medianen Antikörperkonzentrationsniveaus) rein statistisch betrachtet als signifikant angesehen werden kann, ist er höchstwahrscheinlich von keinerlei klinischer Relevanz.

Die höheren Antikörperkonzentrationen in der Gruppe der 20- bis 29-jährigen Probanden spiegeln wahrscheinlich den größeren Anteil an allen HEV Positiven wider, die sich vor kurzem mit HEV infiziert hatten. Folglich weisen diese Probanden höhere Antikörperkonzentrationen, verglichen mit denjenigen auf, deren Antigenkontakt weiter zurück lag, da die Antikörperkonzentrationen von Anti-HEV IgG im Allgemeinen mit der Zeit abnehmen (33). Das Geschlecht hingegen hatte keinen Einfluss auf die Anti-HEV IgG Antikörperkonzentration. Die Arbeitsgruppe um Bendall et al. (34) konnte ebenfalls keine Beziehung zwischen HEV IgG Konzentrationen und (unter anderen Variablen) dem Geschlecht finden. Zhang und seine Kollegen untersuchten die so genannten geometric mean concentrations (GMC) von Anti-HEV IgG Antikörpern in einer Studie über Probanden, welche ihre Immunität zum Teil durch direkten Erregerkontakt und zum Teil durch Impfung erworben hatten. Die GMC der seropositiven Probanden war hier konstant zwischen verschiedenen Alters- und Geschlechtsgruppen (35).

Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Kontrast zur kontinuierlichen Zunahme an gemeldeten akuten Hepatitis E Fällen in den letzten Jahren. Hepatitis E ist eine meldepflichtige Erkrankung

in 17 von 28 europäischen Ländern (36). Vier zusätzliche Länder haben in Ermangelung eines Meldesystems eine Überwachung durch Hepatitis E Referenzlaboratorien eingerichtet. Seit dem Jahr 2009 beobachten viele Länder eine sprichwörtliche Explosion der labordiagnostisch bestätigten autochthonen Hepatitis E Fälle (2009–2014, Italien: +130 %, Finnland: +250 %, Ungarn: +350 %, England und Wales: +500 %, Deutschland: +615 %, Frankreich +875 %) (36). Dieser allgemeingültige Trend kann nicht geleugnet werden, auch wenn an dieser Stelle eine vorsichtige Interpretation aufgrund der höchst unterschiedlichen Meldesysteme und Falldefinitionen zwischen den Ländern der europäischen Union angeraten ist. In Deutschland ist eine Infektion mit dem HE Virus dann meldepflichtig, wenn der Patient klinische Symptome aufweist und sich die Infektion laborchemisch wie folgt bestätigen lässt: Entweder (a) ein positiver Nachweis von Anti-HEV IgM Antikörpern oder (b) eine Zunahme des IgG Titers in zwei unterschiedlichen Proben oder (c) der Nachweis von HEV RNA in der Probe. Solange noch keine Notwendigkeit besteht, einen akuten Fall von Hepatitis E mittels RNA Nachweis zu bestätigen, ist es durchaus denkbar, dass ein Teil der gemeldeten akuten Fälle eigentlich auf vorausgegangene Infektionen (IgM Antikörper persistieren für gewöhnlich mindestens für vier Monate post infectionem) (37) oder falsch positive IgM-Testungen zurückzuführen ist. In der Tat kann im deutschen Referenzlabor nur in 40 % der Proben, welche positiv für Anti-HEV IgM getestet werden, HEV RNA mittels RT-qPCR nachgewiesen werden (anhand eigener, nicht veröffentlichter Daten). Weiterhin wird davon ausgegangen, dass das Phänomen, welches das Hepatitis-E-Virus als ein zunehmend verbreitetes Pathogen in Deutschland erscheinen lässt, zum einen durch die wachsende Aufmerksamkeit dem Erreger als Verursacher einer autochthonen Erkrankung gegenüber erklärbar ist und zum anderen durch die großflächigere Verbreitung sensitiver serologischer Testsysteme.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen einen signifikanten Abfall der Seroprävalenz unter den jungen Erwachsenen. Diese Tatsache spricht für einen deutlichen Rückgang des HEV Infektionsdruckes während der letzten Jahrzehnte. Beispielsweise hatten in den Jahren 2003 und 2006 die jüngeren Altersgruppen unserer Untersuchung theoretisch die gleiche Seroprävalenzrate annähernd zehn Jahre später (23 % vs. 22 % und 19 % vs. 20 %). Diese Reduktion des Hepatitis-E-Virus Infektionsrisikos ist vereinbar mit den Ergebnissen einer Studie über die Evolutionsgeschichte und Populationsdynamik des HE-Virus: Auf der Basis von Computermodellen nehmen die Autoren an, dass die Genotypen 3 und 4 in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts einen Zuwachs in der Populationsgröße erlebt haben, gefolgt von einem Rückgang unklarer Ursache um das Jahr 1990 (38). Eine zweite Studie aus Japan kommt zu

ähnlichen Schlüssen. Allerdings zeigt das entsprechende Modell einen Zuwachs der Populationsgröße von HEV Genotyp 3 in Japan um die Jahre 1960–1970 gefolgt von einer Abnahme um das Jahr 2000 (39).

Die Zahl der gemeldeten Hepatitis E Fälle in Deutschland hat während der letzten Jahrzehnte beträchtlich zugenommen. Interessanterweise stieg der Anteil der gemeldeten Hepatitis E Fälle bei Patienten im Alter über 50 Jahre ebenfalls beträchtlich an, während der Anteil derer im Alter zwischen 20 und 29 Jahren und 30–39 Jahren kontinuierlich abnahm. Ein ähnlicher Trend zeichnet sich im Freistaat Bayern ab, dem der Großteil unseres Studienkollektivs entstammt. Dies kann durch den Rückgang des HEV-Infektionsdruckes in den letzten Jahrzehnten erklärt werden. Dieser Rückgang könnte zu einem größeren Anteil an potenziell infizierbaren Personen und folglich zu mehr gemeldeten akuten Fällen innerhalb der älteren Altersgruppe geführt haben. Dies ist ebenso vereinbar mit der beobachteten niedrigeren Seroinzidenz der jungen Erwachsenen im letzten Jahrzehnt. Innerhalb der gleichen Zeitspanne war stets die Mehrheit der erkrankten Personen männlich (2003: 82 %, 2006: 65 %, 2009: 66 %, 2012: 63 %, 2015: 61 %). Mit der vorliegenden Untersuchung konnte erstmals in einer Seroprävalenzstudie zum Hepatitis-E-Virus ein geschlechtsspezifischer Effekt bei jungen Erwachsenen zwischen 20 und 39 Jahren festgestellt werden. Beide Beobachtungen können zusammengefasst werden als ein ansteigender allgemeiner Trend bezüglich Männern und älteren Personen, welche an einer autochthonen HEV-Infektion erkranken (2).

Eine Einschränkung dieser Untersuchung bestand darin, dass lediglich Überstände von Seren der täglichen Routinediagnostik einer begrenzten geographischen Herkunft getestet wurden. Aufgrund des Studiendesigns kann nicht ausgeschlossen werden, dass manche Proben von immunsupprimierten Personen stammen, was die quantitativen Daten geringfügig beeinflussen könnte. Jedoch ist sicher, dass dies nicht in bemerkenswerter Art und Weise die gesamten quantitativen und qualitativen Ergebnisse der Studie verzerrt. Die Generalisierbarkeit der Ergebnisse mag insofern eingeschränkt sein, als dass die getesteten Serumproben nicht aus einer randomisierten Studienpopulation der gesamten deutschen Bevölkerung stammen und die Ergebnisse daher keine Rückschlüsse auf die Situation im gesamten Land erlauben.

Um einen potenziellen Selektionsbias ausschließen zu können, wurde die Herkunft aller Proben unter anderem bezüglich der einsendenden medizinischen Fachrichtung analysiert. Hierbei konnte keine nennenswerte Veränderung über den betrachteten Zeitraum festgestellt werden,

was nahelegt, dass es tatsächlich zu keinen Veränderungen der einsendenden Einrichtungen in das Labor des Institutes für medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburgs gab. Ferner gilt die Blutentnahme als gängige Praxis im klinischen Alltag, welche aufgrund einer weiten Bandbreite an medizinischen Indikationen durchgeführt wird. Daher wird das Risiko, dass eine bestimmte Gruppe an Individuen überrepräsentiert war und dadurch die Ergebnisse verzerren konnte, als gering eingestuft. Darüber hinaus kann ein Antwortbias in der Untersuchung ausgeschlossen werden, da für die getesteten Individuen keine Notwendigkeit bestand, auf eine Studieneinladung zu reagieren.

Unter Beachtung der Methodenentwicklung und Ergebnisqualitätskontrolle kann festgestellt werden, dass die Untersuchung dem Anspruch einer im Kontext der aktuellen Entwicklung der Forschung zu Prävalenzen der Hepatitis E vergleichbaren und standardisierten Studie gerecht wird.

Wie auch durch Bendall et al. (32) bereits gezeigt, lässt sich das qualitative Testsystem „Anti-HEV IgG ELISA“ der Firma Beijing Wantai durch das Mitführen einer Standardkurve aus WHO-Referenzserum in einen quantitativen Test überführen. Das Mitführen der Standardverdünnungen sollte dennoch chargenspezifisch gehandhabt werden, um einer eventuellen Verschiebung des quantifizierbaren Bereiches sicher Rechnung zu tragen.

Durch die Quantifizierung eines der kommerziell erhältlichen, derzeit eines der sensitivsten Testsysteme (19) mit einem weltweit erhältlichen WHO-Referenzserum ist nun nicht nur der Vergleich qualitativer Ergebnisse dieser Arbeit, sondern auch der Vergleich der Anti-HEV IgG Antikörperkonzentrationen der als positiv getesteten Proben möglich.

Als Vorteil dieser Untersuchung lässt sich die statistisch fundierte Aussagekraft anführen, welche durch die hohe Anzahl an getesteten Proben im Vergleich zu anderen HEV Prävalenzstudien (16,18,40) erzielt wurde.

Das endgültige Studiendesign lässt sich in der Theorie noch näher der spezifischen Fragestellung der Prävalenzentwicklung in der Altersgruppe der 18- bis 21-Jährigen in der jüngeren Vergangenheit anpassen. Hierfür ist in dieser Altersgruppe eine höhere Probenzahl erforderlich, was auch das statistisch signifikante Abklären der Prävalenzdynamik möglich macht. Diese Studie ist jedoch durch die tatsächliche Anzahl an in der hiesigen Biobank vorhandenen Proben limitiert. Die Anzahl der vorhandenen Proben wurde mit 600 Proben pro

Jahr in den ausgewählten Altersgruppen maximal ausgeschöpft. Des Weiteren wurden die Altersgruppen an die vorausgegangene Arbeit der Arbeitsgruppe (15) angepasst, um eine bessere Vergleichbarkeit der eigenen Ergebnisse sicherzustellen.

Die endgültigen Studienergebnisse beantworten die eingangs gestellten Fragen zur Entwicklung der Anti-HEV IgG-Antikörper Seroprävalenz wie folgt: Es lässt sich sagen, dass eine Abnahme der Anti-HEV IgG Prävalenz bei jungen Erwachsenen gezeigt werden konnte. Die Prävalenz bleibt seit 2012 auf dem niedrigen Niveau von 18 % konstant. Die mediane Konzentration spezifischer Antikörper ist praktisch die gleiche über all die untersuchten Jahre hinweg. Eine niedrige Rate an Anti-HEV positiven Individuen in einer Population stellt eine infektiologisch vulnerable Grundlage dar und könnte die sprichwörtliche „Ruhe vor dem Sturm“ sein und somit einer höheren Infektionsrate vornehmlich unter jungen Erwachsenen vorausgehen.

5 Ausblick

Die vorliegende Untersuchungen konnte die These stützen, wonach die gesteigerte Aufmerksamkeit, die dem Erreger der Virushepatitis E seit rund zehn Jahren zuteil wird, und die wohl auch zu den nahezu exponentiell gestiegenen Meldezahlen dieser Erkrankung beigetragen hat, nicht mit einer entsprechend rasanten Ausbreitung des Virus innerhalb der Bevölkerung einhergeht. Dennoch ist es natürlich gerechtfertigt, die epidemiologische Situation auch künftig genauer zu betrachten. So haben die Beobachtungen in Irland und dem Vereinigten Königreich sowie in den Niederlanden bereits zur Einführung der Blutspendertestung auf das HEV geführt (41). Aktuell erging nun auch in Deutschland der Beschluss des Paul Ehrlich Institutes, wonach ab dem 01.01.2020 Blutspender generell auf das Vorhandensein von HEV RNA getestet werden müssen, um die weitere Übertragung mittels Blutprodukten zu verhindern (42).

Nichtsdestotrotz ist es weiterhin notwendig, mehr Arbeit in die Aufklärung und Reduktion der HEV Infektionsquellen und Reservoirs zu investieren. Darüber hinaus bedarf es einem genauen infektiologischen Monitoring sowie Wachsamkeit und kritischer Interpretation bei eigenen Kontrollmessungen. Auch vergleichbare Studien, um die Entwicklung der Prävalenz in verschiedenen geographischen Regionen zu untersuchen, sind unter diesen Bedingungen wünschenswert.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Art. Nr.	Artikelnummer
BSA	Bovines Serumalbumin
C_{ak}	Anti-HEV IgG Antikörperkonzentration in WHO Units/ml
CO	Cut-off
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F.	Frauen
GMC	geometric mean concentration
HEV	Hepatitis-E-Virus
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IQR	Interquartilsbereich
J.	Jahre
M.	Männer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
n	Anzahl
N	Stichprobengröße
NIBSC	The National Institute for Biological Standards and Control
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p	nachweisbarer Effekt
P	Power
PBS _o	phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
PP	Polypropylen
RNA	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Reverse-Transkriptase-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion
S/CO	Signal to Cut off

WHO	World Health Organisation
WU	World Health Organisation Units
w/v	Gewicht/Volumen
α	Signifikanzniveau
μ l	Mikroliter
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studiendesign.....	13
Abbildung 2: Gemittelte Kalibrationsmesswerte (OD) versus Cut-off (CO)	15
Abbildung 3: Box and Whisker Plots der vier Kalibrationspunkte.....	22
Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der OD/CO Werte der Kalibrationspunkte.....	23

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendetet Geräte	8
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	9
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	10
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Computerprogramme.....	10
Tabelle 5: Verteilung der Leitregionen der Postleitzahlen der Einsender	21

7 Literaturverzeichnis

1. Lapinski TW, Jaroszewicz J. Hepatitis E Virus infection - a new threat for Europe. *Przegl Epidemiol.* 2016;70(1):11-4, 103-6.
2. Lewis HC, Wichmann O, Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous Hepatitis E Virus infection in Europe: A systematic review. *Epidemiol Infect.* 2010;138(2):145–66. doi:10.1017/S0950268809990847
3. Huzly D, Umhau M, Bettinger D, Cathomen T, Emmerich F, Hasselblatt P, Hengel H, Herzog R, Kappert O, Maassen S, Schorb E, Schulz-Huotari C, Thimme R, Unmüssig R, Wenzel JJ, Panning M. Transfusion-transmitted hepatitis E in Germany, 2013. *Euro Surveill.* 2014;19(21).
4. Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, Micco P de, Tamalet C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):648–9. doi:10.3201/eid1304.061387
5. Robert Koch-Institut (RKI). Aktuelle Statistik meldepflichtiger Krankheiten, Deutschland: 1. Woche 2011. *Epidemiologisches Bulletin.* 2011;(4):34.
6. Robert Koch-Institut (RKI). Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten, Deutschland: 17. Woche 2016. *Epidemiologisches Bulletin.* 2016;(20):182.
7. Pischke S, Behrendt P, Bock C-T, Jilg W, Manns MP, Wedemeyer H. Hepatitis E in Germany - an under-reported infectious disease. *Deutsches Ärzteblatt international.* 2014;111(35-36):577–83. doi:10.3238/arztebl.2014.0577
8. Robert Koch-Institut (RKI). Hepatitis-E-Virus-Infektion aus virologischer Sicht. *Epidemiologisches Bulletin.* 2015;(15):119–27.
9. van den Berg B, van der Eijk AA, Pas SD, Hunter JG, Madden RG, Tio-Gillen AP, Dalton HR, Jacobs BC. Guillain-Barre syndrome associated with preceding Hepatitis E Virus infection. *Neurology.* 2014;82(6):491–7. doi:10.1212/WNL.000000000000111
10. van Eijk, Jeroen J J, Madden RG, van der Eijk, Annemiek A, Hunter JG, Reimerink JHJ, Bendall RP, Pas SD, Ellis V, van Alfen N, Beynon L, Southwell L, McLean B, Jacobs BC, van Engelen, Baziel G M, Dalton HR. Neuralgic amyotrophy and Hepatitis E Virus infection. *Neurology.* 2014;82(6):498–503. doi:10.1212/WNL.000000000000112
11. Kamar N, Selves J, Mansuy J-M, Ouezzani L, Peron J-M, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel J-P, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 2008;358(8):811–7. doi:10.1056/NEJMoa0706992

12. Banas B, Tausch U, Hofstädter F, Woenkhaus M, Pietrzyk MC, Böhm S, Rohrhofer A, Riegger GAJ, Krämer BK, Jilg W. Autochthonous Hepatitis E-Virus Infection in an Immunocompromised Patient: First Report of a Chronic Course and Molecular Characterization of the Virus. *Z Gastroenterol.* 2005;43(01). doi:10.1055/s-2005-862283
13. Witzhausen C, Müller S, Schönfeld S, Halbauer J, Wesp K, Heiden M, Hensler O, Hanschmann K, Keller-Stanislawski B. Hämovigilanz-Bericht des Paul Ehrlich Institutes 2013/2014: Auswertung der Meldungen von schwerwiegenden Transfusionsreaktionen nach §63iAMG [Internet]. 2015. Available from: www.pei.de/haemovigilanzbericht
14. Pischke S, Heim A, Bremer B, Raupach R, Horn-Wichmann R, Ganzenmueller T, Klose B, Goudeva L, Wagner F, Oehme A, Manns MP, Wedemeyer H. Hepatitis E: An Emerging Infectious Disease in Germany? *Zeitschrift für Gastroenterologie.* 2011;49(9):1255–7. doi:10.1055/s-0031-1273394
15. 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;60(4):1180–6. doi:10.1002/hep.27244
16. 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
17. Zaaier HL. No artifact, hepatitis E is emerging. *Hepatology.* 2015;62(2):654. doi:10.1002/hep.27611
18. Lapa D, Capobianchi MR, Garbuglia AR. Epidemiology of Hepatitis E Virus in European Countries. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):25711–43. doi:10.3390/ijms161025711
19. Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Jilg W. Test performance characteristics of Anti-HEV IgG assays strongly influence hepatitis E seroprevalence estimates. *The journal of Infectious Diseases.* 2013;207(3):497–500. doi:10.1093/infdis/jis688
20. Faber MS, Wenzel JJ, Jilg W, Thamm M, Hohle M, Stark K. Hepatitis E Virus Seroprevalence among Adults, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(10):1654–7. doi:10.3201/eid1810.111756
21. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007;39(2):175–91.
22. Faber M, Willrich N, Schemmerer M, Rauh C, Kuhnert R, Stark K, Wenzel JJ. Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. *J Viral Hepat.* 2018;25(6):752–8. doi:10.1111/jvh.12868

23. Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, Saune K, Arnaud C, Pelletier B, Morel P, Legrand D, Tiberghien P, Izopet J. A Nationwide Survey of Hepatitis E Viral Infection in French Blood Donors. *Hepatology*. 2016;63(4):1145–54. doi:10.1002/hep.28436
24. Holm DK, Moessner BK, Engle RE, Zaaijer HL, Georgsen J, Purcell RH, Christensen PB. Declining prevalence of hepatitis E antibodies among Danish blood donors. *Transfusion*. 2015;55(7):1662–7. doi:10.1111/trf.13028
25. Chenyu Xu, Richard Y. Wang, Cathy A. Schechterly, Shengxiang Ge, James W. Shih, Ning-Shao Xia, Naomi L.C. Luban and Harvey J. Alter. An Assessment of Hepatitis E Virus in US Blood Donors and Recipients: No Detectable HEV RNA in 1939 Donors Tested and No Evidence For HEV Transmission to 362 Prospectively Followed Recipients. *Transfusion*. 2013.
26. Lange H, Overbo J, Borgen K, Dudman S, Hoddevik G, Urdahl AM, Vold L, Sjurseth SK. Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiol Infect*. 2017;145(1):181–6. doi:10.1017/S0950268816002144
27. Schielke A, Ibrahim V, Czogiel I, Faber M, Schrader C, Dremsek P, Ulrich RG, John R. Hepatitis E Virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect Dis*. 2015;15440. doi:10.1186/s12879-015-1199-y
28. Krems C, Walter C, Heuer T, Hoffmann I. Nationale Verzehrstudie II: Lebensmittelverzehr und Nährstoffzufuhr auf Basis von 24h Recalls [Internet]. 2013. Available from: https://www.mri.bund.de/fileadmin/MRI/Institute/EV/Lebensmittelverzehr_N%C3%A4hrstoffzufuhr_24h-recalls-neu.pdf
29. 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(1):50–4. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.006
30. Hartl J, Otto B, Madden RG, Webb G, Woolson KL, Kriston L, Vettorazzi E, Lohse AW, Dalton HR, Pischke S. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis. *Viruses*. 2016;8(8). doi:10.3390/v8080211
31. Pas SD, Streefkerk RHRA, Pronk M, Man RA de, Beersma MF, Osterhaus ADME, van der Eijk AA. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *J Clin Virol*. 2013;58(4):629–34. doi:10.1016/j.jcv.2013.10.010

32. 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(1):95–101. doi:10.1002/jmv.21033
33. Schemmerer M, Rauh C, Jilg W, Wenzel JJ. Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults. *J Viral Hepat.* 2016. doi:10.1111/jvh.12621
34. 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(5):799–805. doi:10.1002/jmv.21656
35. Zhang J, Zhang X-F, Zhou C, Wang Z-Z, Huang S-J, Yao X, Liang Z-L, Wu T, Li J-X, Yan Q, Yang C-L, Jiang H-M, Huang H-J, Xian Y-L, Shih JW-K, Ng M-H, Li Y-M, Wang J-Z, Zhu F-C, Xia N-S. Protection against Hepatitis E Virus infection by naturally acquired and vaccine-induced immunity. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(6):O397-405. doi:10.1111/1469-0691.12419
36. Adlhoch C, Avellon A, Baylis SA, Ciccaglione AR, Couturier E, Sousa R de, Epstein J, Ethelberg S, Faber M, Fehér Á, Ijaz S, Lange H, Mand'áková Z, Mellou K, Mozalevskis A, Rimhanen-Finne R, Rizzi V, Said B, Sundqvist L, Thornton L, Tosti ME, van Pelt W, Aspinall E, Domanovic D, Severi E, Takkinen J, Dalton HR. Hepatitis E Virus: Assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15. *J Clin Virol.* 2016;829–16. doi:10.1016/j.jcv.2016.06.010
37. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, Cai J, Jiang L, Wu T, Wang Z, Guan L, Shih JWK, Ng M-H, Zhu F, Zhang J, Xia N. Profile of Acute Infectious Markers in Sporadic Hepatitis E. *PLoS One.* 2010;5(10):e13560. doi:10.1371/journal.pone.0013560
38. Purdy MA, Khudyakov YE. Evolutionary History and Population Dynamics of Hepatitis E Virus. *PLoS One.* 2010;5(12):e14376. doi:10.1371/journal.pone.0014376
39. Nakano T, Takahashi K, Pybus OG, Hashimoto N, Kato H, Okano H, Kobayashi M, Fujita N, Shiraki K, Takei Y, Ayada M, Arai M, Okamoto H, Mishiro S. New findings regarding the epidemic history and population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 Hepatitis E Virus inferred by molecular evolution. *Liver Int.* 2012;32(4):675–88. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02728.x
40. Lanini S, Garbuglia AR, Lapa D, Puro V, Navarra A, Pergola C, Ippolito G, Capobianchi MR. Epidemiology of HEV in the Mediterranean basin: 10-year prevalence in Italy. *BMJ Open.* 2015;5(7):e007110. doi:10.1136/bmjopen-2014-007110

41. Domanović D, Tedder R, Blümel J, Zaaijer H, Gallian P, Niederhauser C, Sauleda Oliveras S, O'Riordan J, Boland F, Harrithøj L, Nascimento MSJ, Ciccaglione AR, Politis C, Adlhoch C, Flan B, Oualikene-Gonin W, Rautmann G, Strengers P, Hewitt P. Hepatitis E and blood donation safety in selected European countries: A shift to screening? *Euro Surveill.* 2017;22(16). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.16.30514
42. Cichutek K. Abwehr von Arzneimittelrisiken; Stufenplan Stufe 2: Anordnung der Testung von Blutspendern zur Verhinderung einer Übertragung von Hepatitis-E-Virus durch Blutkomponenten zur Transfusion und Stammzellzubereitungen zur hämatopoetischen Rekonstitution [Internet]. 2019. Available from: https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/vigilanz/haemovigilanz/bescheide/2019-02-05-abwehr-arzneimittelrisiken-testung-blutspender-hepatitis-e.pdf?__blob=publicationFile&v=3

ARTICLE

Open Access

Continuous decline of hepatitis E virus seroprevalence in southern Germany despite increasing notifications, 2003–2015

Hannah Mahrt¹, Mathias Schemmerer¹, Gundula Behrens², Michael Leitzmann², Wolfgang Jilg¹ and Jürgen J. Wenzel¹

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is viewed as an emerging pathogen. Many European countries, including Germany, have observed a steep increase of notified autochthonous hepatitis E cases in recent years. Our study investigated time trends in HEV seroprevalence in southern Germany between 2003 and 2015. A total of 3000 study sera were evenly distributed over sampling years 2003, 2006, 2009, 2012, and 2015, two age groups (20–29 and 30–39 years) and genders and were tested for anti-HEV IgG. Positive samples were quantified. The seroprevalence declined from 32.8% in 2003 over 22.5% in 2006 ($p < 0.001$) and 22.3% in 2009 to 17.7% and 17.8% in 2012 and 2015. A higher prevalence was found for males ($p = 0.018$) and the older age group ($p < 0.001$). Anti-HEV IgG concentrations ranged from 0.22 to 1783.19 WU mL⁻¹. A higher median concentration (2.41 vs. 1.89 WU mL⁻¹, $p < 0.001$) was found in the younger age group. The anti-HEV IgG seroprevalence decreased since 2003 and remains constant at ~18% since 2012. A rather low anti-HEV prevalence in young adults is indicative of a susceptible population and denotes a higher risk of HEV infections in this age group in the future. Therefore, reduction of HEV infection sources, close monitoring, and vigilance for proper control measures are warranted.

Introduction

The hepatitis E virus (HEV) is a single-stranded, non-enveloped RNA virus identified in 1983¹. This virus in the genus *Orthohepevirus* has increasingly attracted attention since 2008^{2,3}. While there is only one known serotype, HEV genotypes differ by their epidemiology. Initially, HEV was associated with waterborne outbreaks in developing countries (genotypes 1 and 2). However, since 2008, an increasing number of foodborne zoonotic infections worldwide, caused by genotypes 3 and 4, have been reported.

The majority of HEV infections in Europe is reportedly caused by genotype 3 and is not travel associated. Known animal reservoirs include pigs, wild boars, and deer. Sources of infection are raw or undercooked meat as well as other contaminated food⁴. Moreover, transfusion-transmitted hepatitis E is well documented in several cases^{5–7}. The vast majority of autochthonous HEV infections are usually asymptomatic and resolve without any known sequelae⁸.

There is a continuous increase of mainly autochthonous acute cases in Europe (e.g., 220 cases in 2010 vs. 1983 cases in 2016 in Germany; <https://survstat.rki.de>). However, the seroprevalence trends in various European countries are discordant. For example, a decrease in seroprevalence between 1991 and 2013 was reported for England⁹, Denmark¹⁰ and Germany^{11,12}, while in the

Correspondence: Jürgen J. Wenzel (juergen.wenzel@ukr.de)

¹Institute of Clinical Microbiology and Hygiene, University Medical Center Regensburg, 93053 Regensburg, Germany

²Department of Epidemiology and Preventive Medicine, University of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany

These authors contributed equally: Hannah Mahrt, Mathias Schemmerer
Preliminary results from this study were presented at the ECCMID conference, 22–25 April 2017, Vienna, Austria.

© The Author(s) 2018



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Netherlands an ~7% increase of anti-HEV IgG prevalence was reported between 2000 and 2010 among subjects aged 18–21 years^{13,14}.

In this study, we hypothesize that if HEV infection is re-emerging in Europe, there should be an increase in seroprevalence especially in young adults, where a large proportion of subjects is seronegative and susceptible to infection. Therefore, we analyzed (i) whether there has been an increase in anti-HEV IgG prevalence among subjects aged 20–39 years in southern Germany between 2003 and 2015 and (ii) if anti-HEV IgG concentrations have changed or have shown age- or gender-specific variations over this time period. To address these questions, we qualitatively and quantitatively analyzed sera of 3000 individuals from 2003, 2006, 2009, 2012, and 2015 for the presence of anti-HEV IgG.

Results

Qualitative analysis

Our results show a time-dependent decrease of the anti-HEV IgG prevalence in the study population (Fig. 1a). The decrease started with 32.8% (2003) over 22.5% (2006) and 22.3% (2009), ended at 17.7% (2012) and remained constant at 17.8% in 2015. In total, a statistically significant ($p < 0.001$) decrease of 15.0% was observed when comparing 2003 and 2015.

When analyzing the sampling year groups according to age or gender, we observed that the prevalences in these groups mirrored the observed overall decrease (Fig. 1b, c). When comparing 2003 and 2015, the decrease was statistically significant for male ($p = 0.001$), female ($p < 0.001$), 20–29-year-old ($p = 0.03$), and 30–39-year-old ($p < 0.001$) subjects. The slight increase of prevalence in males as well as in the age group of 20–29 years between 2012 and 2015 was not statistically significant ($p = 0.836$ and $p = 0.487$) (Table 1).

Apart from longitudinal changes, the anti-HEV IgG prevalence was significantly higher for men than women in 2006 and 2009 ($p < 0.05$). For the remaining years, there were no significant differences between gender-specific prevalences (Fig. 1b). Between 2003 and 2012, we observed statistically significantly higher prevalences for subjects aged 30–39 years than for the younger ones (2003: $p < 0.001$; 2006 borderline: $p = 0.051$; 2009: $p = 0.002$; 2012: $p = 0.007$). However, in 2015 there was no significant difference in prevalence between the age groups (Fig. 1c).

When analyzing additional subgroups (i.e., sampling year groups, further subdivided into gender-specific age groups; $n = 150$), the largest differences in prevalence were found between women aged 20–29 years and men aged 30–39 years: 2003 (23.3% vs. 40.0%, $p = 0.003$), 2006 (14.7% vs. 29.3%, $p = 0.003$), 2009 (15.3% vs. 34.0%,

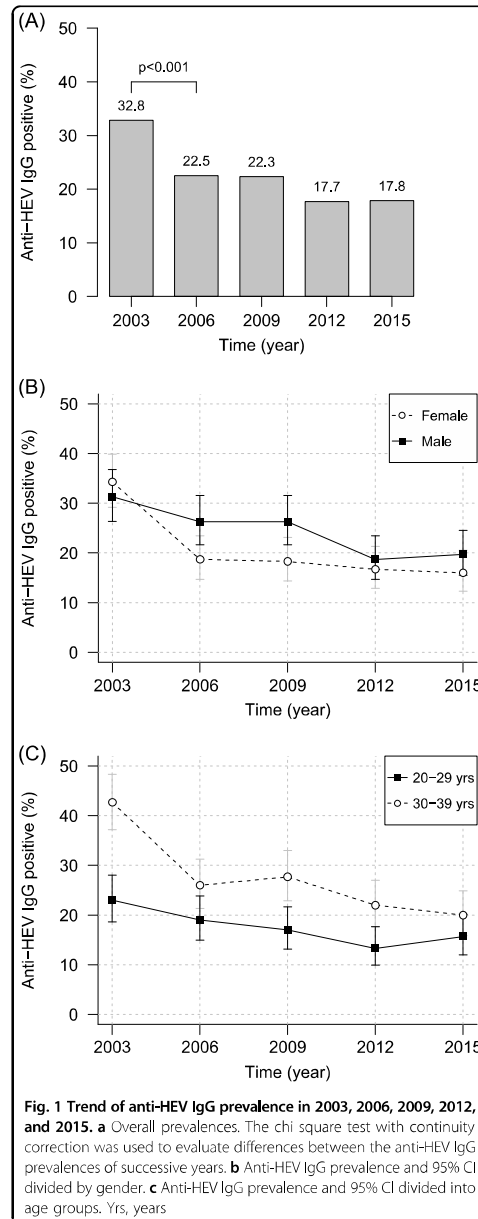
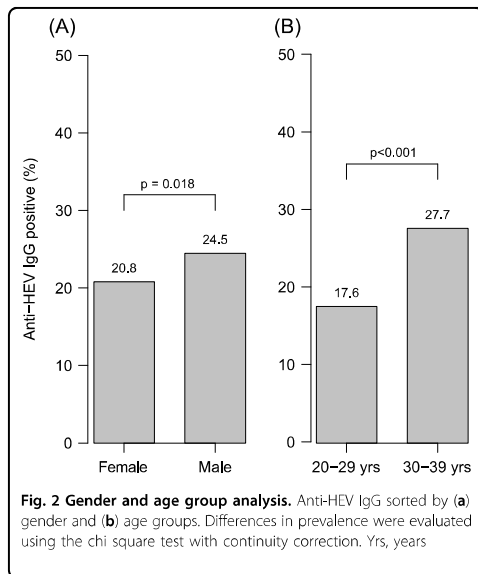


Fig. 1 Trend of anti-HEV IgG prevalence in 2003, 2006, 2009, 2012, and 2015. **a** Overall prevalences. The chi square test with continuity correction was used to evaluate differences between the anti-HEV IgG prevalences of successive years. **b** Anti-HEV IgG prevalence and 95% CI divided by gender. **c** Anti-HEV IgG prevalence and 95% CI divided into age groups. Yrs, years

$p < 0.001$), and 2012 (11.3% vs. 22.0%, $p = 0.02$). Also, higher prevalences were identified for women aged 30–39

Table 1 Anti-HEV IgG prevalence, overall, and by age and gender (percentages and absolute numbers of positives)

	2003	2006	2009	2012	2015
Overall	32.8% (197/600)	22.5% (135/600)	22.3% (134/600)	17.7% (106/600)	17.8% (107/600)
Gender					
Female	34.3% (103/300)	18.7% (56/300)	18.3% (55/300)	16.7% (50/300)	16.0% (48/300)
Male	31.3% (94/300)	26.3% (79/300)	26.3% (79/300)	18.7% (56/300)	19.7% (59/300)
Age group					
20–29 years	23.0% (69/300)	19.0% (57/300)	17.0% (51/300)	13.3% (40/300)	15.7% (47/300)
30–39 years	42.7% (128/300)	26.0% (78/300)	27.7% (83/300)	22.0% (66/300)	20.0% (60/300)

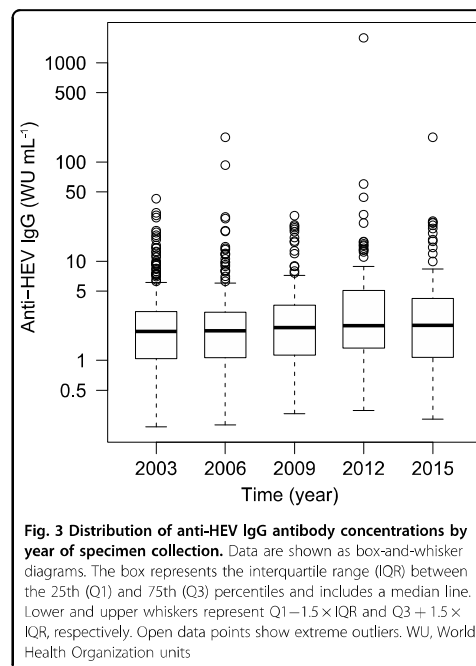


years compared to women aged 20–29 years in 2003 ($p < 0.001$) and 2012 ($p = 0.02$). Other subgroup-specific prevalences only differed marginally.

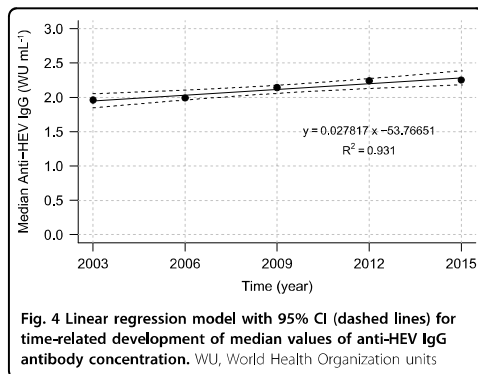
When considering only gender and age groups apart from sampling year groups, it became evident that male subjects were more often positive for anti-HEV IgG than females (24.5% vs. 20.8%, $p = 0.018$) (Fig. 2a). A similar observation was made for subjects aged 30–39 years in comparison to those aged 20–29 years (27.7% vs. 17.6%, $p < 0.001$) (Fig. 2b).

Quantitative analysis

The absolute concentration of anti-HEV IgG was determined in all specimens that tested positive ($SCR \geq 1$). The concentration ranged from 0.22 to 178.05 WU mL⁻¹, with



the exception of one positive sample containing an exceptionally high concentration of 1783.19 WU mL⁻¹ (a woman aged between 30 and 39 years, sampled in 2012). Figure 3 shows the distribution of concentration measurements for each sampling year as separate box-and-whisker diagrams. Figure 4 shows a linear regression model which was generated by fitting the median concentration values for each sampling year (1.96, 1.99, 2.14, 2.24, and 2.25 WU mL⁻¹). However, the model only predicted a marginal overall annual increase of median anti-HEV IgG concentrations of about 0.03 WU mL⁻¹ (Fig. 4).



The evaluation of the group-specific anti-HEV IgG concentrations showed that gender had no influence on the overall concentration level, regardless of the sampling year. In figures, the median value for males was 2.14 WU mL⁻¹ compared to that of females with 2.06 WU mL⁻¹ ($p = 0.586$). When regarding age groups, the median anti-HEV IgG concentration of subjects aged 20–29 years was significantly higher compared to subjects aged 30–39 years (2.41 vs. 1.89 WU mL⁻¹, $p < 0.001$).

Discussion

In this study, the development of anti-HEV IgG prevalence and concentration was investigated in adults aged 20–39 years between 2003 and 2015 in southern Germany. Our results demonstrate (i) a significant overall decrease of anti-HEV IgG-positive young adults, among which men and the upper age group (30–39 years) have the highest prevalence.

Quantitatively noticeable is (ii) a slightly increasing anti-HEV IgG trend with an overall median annual increase of 0.03 WU mL⁻¹. It is also remarkable that younger persons have higher levels of antibodies than older individuals, while there is no gender-specific difference in antibody concentrations.

In a previous study, we found a decline of the HEV-antibody prevalence from 20.5% in 1996 to 14.5% in 2011 by immunoblot analysis in the same region of southern Germany¹¹. In a recently published study, we reported very similar figures for the whole of Germany with 18.6% in 1998 and 15.3% in 2010¹². Therefore, it is tempting to speculate that our current findings might also be generalizable for the whole of Germany. However, caution is advisable at this point since our study was not designed to assess the situation for the whole country and intentionally focused on subjects of 20–39 years of age. Comparability between studies is therefore limited since the former studies included subjects between 18 and 80 years.

Moreover, there may be some geographic regions which do not follow the observed continuous decline, possibly due to regional or dietary factors, as has been reported for France¹⁵.

In Denmark, a comparable decrease of anti-HEV IgG prevalence was observed¹⁰. Using an in-house assay, a prevalence of 32.9% in 1983, 20.6% in 2003, and 10.7% in 2013 was found. In order to achieve more comparable data, the specimens tested in 2013 had been re-tested by the authors using the Wantai assay (which was also used in the present study). The prevalence by means of the Wantai assay was 19.8%, while all subjects which had been tested positive by the in-house assay were found positive by the Wantai assay as well. Although the absolute numbers are hardly comparable to the results found in our study, the time development seen in Denmark is also in line with our findings¹⁰. Using the Wantai assay, a comparable prevalence rate as well as a decrease over time was found in the US: 21.8% in 2006 and 16.0% in 2012¹⁶.

The higher prevalence in the upper age groups may be explained by the cumulative risk of infection over a subject's lifetime. Multiple studies have consistently observed this phenomenon in several geographic regions^{10–12,16,17}.

Surprisingly, we found men significantly more often infected with HEV than women in our study. In contrast, no correlation between anti-HEV IgG positivity and gender has been detected in other seroprevalence studies^{10–12,16}. To our knowledge, this is the first time that a statistically significant gender-specific difference in anti-HEV IgG prevalence was observed. Among the various factors that may lead to a higher anti-HEV IgG prevalence in male subjects, we speculate that men more often engage in specific hobbies or professions that may pose an elevated HEV infection risk, such as hunting or veterinary medicine^{18,19}. Moreover, men in Germany consume more pork than women²⁰, which is considered the most important transmission route of HEV in industrialized countries²¹.

For the Netherlands it was reported that the prevalence of anti-HEV IgG in younger adults increased significantly ($p = 0.016$) from 4.3% (5/116) in 2000 to 12.7% (23/181) in 2011¹³. Our study investigated a comparable time period and study group in southern Germany and allowed us to exclude such an effect. One possible explanation for this difference is the variability in anti-HEV IgG prevalence between different European countries or even smaller geographic regions^{15,22}.

Other authors mentioned differences in laboratory test characteristics as a possible reason for non-comparable and strongly varying HEV prevalence data across European countries^{17,22–24}. In a previous study, we had also observed how differences in the analytic sensitivity of a broadly applied enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) as compared to an immunoblot resulted in differing seroprevalence estimates: for subjects between 20 and 70 years and sampled in 2011, we found 34.3% HEV IgG positive by the former and 14.5% by the latter¹¹. Although such different test characteristics should not influence the ratio between groups tested at different time points with the same test, we decided to use the well characterized and highly sensitive Wantai ELISA in our study, that was additionally calibrated by using the WHO reference reagent²⁵.

Quantitative analyses revealed an increasing level of anti-HEV IgG antibody concentrations over time. Although the overall annual increase of 0.03 WU mL^{-1} (1.59% of the median overall antibody level) was found to be statistically significant, it is very likely not of any clinical relevance.

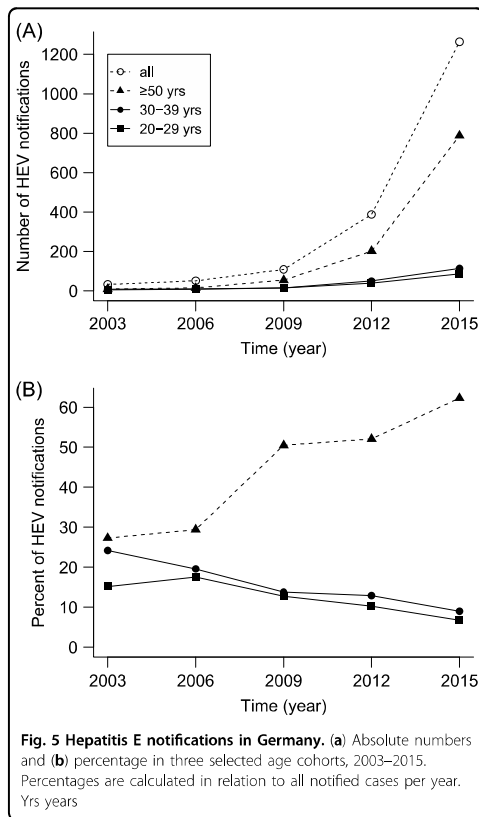
The higher antibody concentrations detected in the lower age group of 20–29 years may reflect a higher proportion of subjects among all positives who have recently experienced the first HEV infection in their lifetime. Consequently, those subjects will likely have higher anti-HEV IgG concentrations as compared to those who had the infection in the more distant past since anti-HEV IgG generally decreases with time²⁶. By comparison, gender had no influence on anti-HEV IgG antibody concentrations. Bendall et al.²⁷ had found no relationship between HEV IgG concentration and (among other variables) gender. Zhang and coworkers had investigated geometric mean concentrations (GMC) of HEV antibodies in a study on subjects with naturally acquired and vaccine-induced immunity: GMC of seropositive subjects were stable among different age groups and between genders²⁸.

Our findings are in contrast to the increasing number of notified acute HEV cases seen in many years. Hepatitis E is a notifiable disease in 17 of 28 European countries²⁹. Four additional countries that lack a notification system have implemented surveillance through HEV reference laboratories. Since 2009, many countries observed a proverbial explosion of laboratory-confirmed autochthonous hepatitis E cases (2009–2014; Italy: +130%, Finland: +250%, Hungary: +350%, England & Wales: +500%, Germany: +615%, France: +875%)²⁹. This common trend cannot be denied, although cautious interpretation is advisable due to highly variable surveillance systems and case definitions within the European Union. In Germany, HEV with clinical symptoms is notifiable as a laboratory-confirmed case, if (a) anti-HEV IgM is present, or if (b) an IgG increase in paired samples is detected, or if (c) HEV RNA is detected. Since there is no directive to confirm a serologically defined case by RNA detection, it is conceivable that part of the notified cases are actually older infections (IgM usually persists at least 4 months)³⁰ or false-positive IgM results. In fact, only 40% of all samples

with positive anti-HEV IgM detection are found positive by HEV RT-qPCR in the German HEV reference laboratory (own unpublished data). Hence, there is good reason to believe in at least some degree of over-reporting of acute HEV cases. Moreover, we speculate that the phenomenon of HEV being an emerging disease in Germany is most probably due to an increased awareness of hepatitis E as an autochthonous infection and due to the broader availability of improved serologic test systems.

The results of our study demonstrate a significant seroprevalence decrease in young adults. These findings indicate a strong reduction in HEV infection pressure over the last decades. For example, in 2003 and 2006, the younger age group in our study had virtually the same seroprevalence rate approximately 10 years later (23% vs. 22% and 19% vs. 20%, Table 1). This reduction in HEV infection risk is in line with results of a study on the evolutionary history and population dynamics of HEV: based on computational modeling, the authors propose that genotypes 3 and 4 experienced an increase in population size in the first half of the twentieth century, followed by a decline of unknown cause around 1990³¹. A second study from Japan points in the same direction. However, the respective model shows an increase in HEV genotype 3 population size around 1960–1970, followed by a decline around 2000³².

The number of officially notified hepatitis E cases has increased considerably during the past decades in Germany. The respective absolute numbers reported between 2003 and 2015 are shown in Fig. 5a for three selected age groups (20–29, 30–39, and ≥ 50 years; data source: <https://survstat.rki.de>). The most prominent absolute increase was recorded in the older age group (≥ 50 years). Interestingly, the proportion of notified hepatitis E in subjects ≥ 50 years has also increased considerably, while the proportion of the age groups between 20–29 and 30–39 years has decreased continuously (Fig. 5b). A similar trend exists in the federal state of Bavaria, where the majority of our study samples was collected (data not shown). This can likely be explained by the decline in HEV infection pressure over the last decades, which results in a higher proportion of susceptible individuals and consecutively more notified acute cases in the older age group in which HEV infections seem to become more often symptomatic. This would also be in line with the observed lower seroincidence in young adults in the last decade. During the same period, the majority of notified cases were males (2003: 82%, 2006: 65%, 2009: 66%, 2012: 63%, 2015: 61%). For the first time in a seroprevalence study on HEV, we found this gender-specific effect in young adults aged 20–39 years. Both observations can be summarized as an increasing general trend for men and older people being reported with autochthonous HEV infections³³.



It is a limitation of our study that we could only test left-over sera of confined geographic origin. Due to the study design we cannot exclude that some samples were derived from immunosuppressed individuals, which could marginally influence quantitative data. However, we assume that this will not notably bias the overall quantitative and qualitative results of the study. Also, the study specimens were not derived from a randomized study of the whole German population that would allow claiming prevalence trends for the entire country. Hence, the generalizability of our results may be limited.

In order to detect a potential selection bias, the origin of all samples was analyzed as to the referring medical specialization. No relevant variations were found over the years (data not shown), indicating that there were indeed no changes in the “drainage area” of our laboratory. Moreover, venipuncture is a frequent medical procedure associated with a wide variety of indications. The potential that a certain group of individuals was over-sampled,

thereby potentially biasing the results, is low. Furthermore, we can exclude a response bias, because there was no need for the study subjects to react to a study invitation.

In summary, our study demonstrates a decreasing anti-HEV IgG prevalence over a decade in young adults. The prevalence has remained constant at around 18% since 2012. The median concentration of specific antibodies was practically the same throughout the investigated time period. A low anti-HEV prevalence in a population is a significant substrate of susceptible population and might be the “silence before a storm”: i.e. a higher rate of HEV infections, especially in young adults in the future. Therefore, more work is needed to elucidate and reduce HEV infection sources and reservoirs. Moreover, close monitoring, vigilance for proper control measures, and comparative studies to investigate the development of prevalence in different geographic regions will be of importance in such conditions.

Materials and methods

Study population

The study cohort consisted of 3000 subjects between 20 and 39 years of age with residence in southern Germany. Medical personnel were excluded in order to ensure that the study cohort represents an acceptable surrogate to the local general population. Apart from that, no criteria other than the donor’s age and date of collection were taken into account. Selection of specimens was not carried out according to any specific indication but was performed using a random sample from all available left-over sera as described below.

Study design

The years 2003, 2006, 2009, 2012, and 2015 were chosen as time-series for the determination of anti-HEV seroprevalence. Since anti-HEV IgG prevalence increases with age^{11,34,35}, only subjects between 20 and 39 years were included to better detect potential prevalence changes. Based on previous results of anti-HEV IgG antibody studies¹¹, we assumed a prevalence rate of 13.4% in 2011 for the age group of 20–39 years. An annual prevalence increase of 0.5% was proposed as a working hypothesis¹³. Using the G*Power 3.1 software³⁶, a sample size of 600 subjects per year was found to be necessary to detect a statistically significant effect with $\alpha = 0.05$ and 95% statistical power.

After applying the exclusion criteria described above and after eliminating duplicate specimens, 15,082 available samples were sorted according to sampling year, age group (20–29 and 30–39 years), and gender. Subsequently, 150 samples per subgroup were randomly chosen using the *sample()* function implemented by the R programming language (R Foundation for Statistical

Computing). By following this approach, a total of 3000 samples were selected.

Sample collection

All study specimens were obtained as part of the daily routine operations of our diagnostic laboratory in 2003 through 2015. Only surplus serum stored at -20°C was used for this study.

Qualitative analysis

All samples were analyzed for anti-HEV IgG using a commercially available (Wantai, China). The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Washing steps were executed using the automated HydroFlex ELISA washer (TECAN, Austria). For interpretation of results, all specimens with a signal-to-cut-off ratio (SCR) ≥ 1 in single determination were considered positive. Samples with an SCR < 1 were considered negative.

Quantitative analysis

To determine absolute anti-HEV IgG concentrations and to adjust for potential product batch and interassay variations, we used the WHO reference reagent for antibodies to HEV (NIBSC code: 95/584). Calibration was done by performing an ELISA run with a twofold reference reagent dilution series. Anti-HEV IgG concentration started from 100 WHO Units per mL (WU mL^{-1}) and was diluted in 20 steps to a final concentration of $1.91 \times 10^{-4} \text{ WU mL}^{-1}$. The measured values showed a typical sigmoid curve (data not shown).

The quantification range was between 0.10 and 15.79 SCR. Only positive samples (SCR ≥ 1) were considered. Specimens with an SCR above the quantification range were diluted and re-tested.

Individual calibrations of each ELISA run were implemented with four standardized WHO reference reagent dilutions covering the approximate quantification range (3.13, 0.78, 0.20, and 0.05 WU mL^{-1}). The SCR values were converted by a linear regression model using SigmaPlot 12.3 (Systat Software Inc., USA) and Microsoft Excel (Microsoft Corp., USA).

Statistical methods

Statistical data analysis was performed using IBM SPSS Statistics 23 (IBM Armonk, USA). For the evaluation of quantitative data, the Mann–Whitney U test was used and for the evaluation of qualitative data a chi-squared test with continuity correction was performed. A statistically significant difference was defined as $p < 0.05$. Confidence intervals (CI) of 95% were calculated with the Wilson score interval. Statistical regression analyses were performed using the R programming language (R Foundation for Statistical Computing).

Acknowledgements

This work was supported by the German Research Foundation (DFG) within the funding programme Open Access Publishing.

Author contributions

WJ, JJW, GB, and ML were involved in the conception, planning, and design of the study. HM and MS performed laboratory experiments. HM, MS, GB, and JJW analyzed and interpreted the data. HM, MS, and JJW wrote the manuscript. All authors critically revised and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 27 March 2018 Revised: 3 July 2018 Accepted: 3 July 2018

Published online: 25 July 2018

References

- Balayan, M. S. et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* **20**, 23–31 (1983).
- Kamar, N. et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **358**, 811–817 (2008).
- Smith, D. B. et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* **95**, 2223–2232 (2014).
- Anonymous. Hepatitis E virus: opinions of the Working Group of the Federal Ministry of Health Blood. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundh. Gesundh.* **58**, 198–218 (2015).
- Boxall, E. et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus. Med.* **16**, 79–83 (2006).
- Colson, P. et al. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 648–649 (2007).
- Huzly, D. et al. Transfusion-transmitted hepatitis E in Germany, 2013. *Euro. Surveill.* **19**, pii: 20812 (2014).
- Pischke, S. et al. Hepatitis E in Germany—an under-reported infectious disease. *Dtsch. Arztebl. Int.* **111**, 577–583 (2014).
- Ijaz, S. et al. Indigenous hepatitis E virus infection in England: more common than it seems. *J. Clin. Virol.* **44**, 272–276 (2009).
- Holm, D. K. et al. Declining prevalence of hepatitis E antibodies among Danish blood donors. *Transfusion* **55**, 1662–1667 (2015).
- Wenzel, J. J. et al. Decline in hepatitis E virus antibody prevalence in south-eastern Germany, 1996–2011. *Hepatology* **60**, 1180–1186 (2014).
- Faber, M. et al. Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroconversion in the German adult population. *J. Viral Hepat.* **25**, 752–758 (2018).
- Hogema, B. M., Molier, M., Slot, E. & Zaaijer, H. L. Past and present of hepatitis E in the Netherlands. *Transfusion* **54**, 3092–3096 (2014).
- Zaaijer, H. L. No artifact, hepatitis E is emerging. *Hepatology* **62**, 654 (2015).
- Mansuy, J. M. et al. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology* **63**, 1145–1154 (2016).
- Xu, C. et al. An assessment of hepatitis E virus (HEV) in US blood donors and recipients: no detectable HEV RNA in 1939 donors tested and no evidence for HEV transmission to 362 prospectively followed recipients. *Transfusion* **53**, 2505–2511 (2013).
- Ijaz, S. et al. Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J. Infect. Dis.* **192**, 1166–1172 (2005).
- Lange, H. et al. Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiol. Infect.* **145**, 181–186 (2017).
- Schielke, A. et al. Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect. Dis.* **15**, 440 (2015).
- Krems, C., Walter, C., Heuer, T. & Hoffmann, I. Nationale Verzehrsstudie II—Lebensmittelverzehr und Nährstoffzufuhr auf Basis von 24h-Recalls. https://www.mni.bund.de/fileadmin/MRI/Institute/EV/Lebensmittelverzehr_N%3%A4hrstoffzufuhr_24h-recalls-neu.pdf (2013).

21. Wenzel, J. J. et al. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J. Clin. Virol.* **52**, 50–54 (2011).
22. Lapa, D., Capobianchi, M. R. & Garbuglia, A. R. Epidemiology of hepatitis E virus in European countries. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 25711–25743 (2015).
23. Hard, J. et al. Hepatitis E seroprevalence in Europe: a meta-analysis. *Viruses* **8**, pii: E211 (2016).
24. Pas, S. D. et al. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *J. Clin. Virol.* **58**, 629–634 (2013).
25. Bendall, R., Ellis, V., Ijaz, S., Thurairajah, P. & Dalton, H. R. Serological response to hepatitis E virus genotype 3 infection: IgG quantitation, avidity, and IgM response. *J. Med. Virol.* **80**, 95–101 (2008).
26. Schemmerer, M., Rauh, C., Jilg, W. & Wenzel, J. J. Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults. *J. Viral Hepat.* **24**, 75–79 (2017).
27. 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.* **82**, 799–805 (2010).
28. Zhang, J. et al. Protection against hepatitis E virus infection by naturally acquired and vaccine-induced immunity. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O397–O405 (2014).
29. Adlhoch, C. et al. Hepatitis E virus: assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15. *J. Clin. Virol.* **82**, 9–16 (2016).
30. Huang, S. et al. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS ONE* **5**, e13560 (2010).
31. Purdy, M. A. & Khudyakov, Y. E. Evolutionary history and population dynamics of hepatitis E virus. *PLoS ONE* **5**, e14376 (2010).
32. Nakano, T. et al. New findings regarding the epidemic history and population dynamics of Japan-indigenous genotype 3 hepatitis E virus inferred by molecular evolution. *Liver. Int.* **32**, 675–688 (2012).
33. Lewis, H. C., Wichmann, O. & Duizer, E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol. Infect.* **138**, 145–166 (2010).
34. Faber, M. S. et al. Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 1654–1657 (2012).
35. Wenzel, J. J., Preiss, J., Schemmerer, M., Huber, B. & Jilg, W. Test performance characteristics of Anti-HEV IgG assays strongly influence hepatitis E seroprevalence estimates. *J. Infect. Dis.* **207**, 497–500 (2013).
36. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A. G. & Buchner, A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods* **39**, 175–191 (2007).

Erklärung gemäß § 6 Absatz 5 Satz 2 Promotionsordnung

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 Arbeit 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:
Emerging Microbes & Infections, Jahrgang 7, Ausgabe 1, Juli 2018, Seite 133,
DOI 10.1038/s41426-018-0136-8

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Wenzel für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge bedanken, die die Entstehung dieser Arbeit begleitet haben. Erwähnenswert ist ganz besonders seine große Geduld, mit der er dieses Projekt so lange und zuverlässig stets wohlwollend begleitet hat.

Auch bei Herrn Prof. Dr. Jilg möchte ich mich für seine bereichernden Beiträge aus seinem großen Erfahrungsschatz und das Aufzeigen neuer Blickwinkel herzlich bedanken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dipl. Ing. (FH) Mathias Schemmerer dankend erwähnen, der mir allzeit als kompetenter und kritischer Gesprächspartner sowie Lehrer sowohl in labortechnischen Fragen als auch im Umgang mit vielen verschiedenen Computerprogrammen bereitwillig zur Verfügung stand und mit dem die Zusammenarbeit immer ein Vergnügen und eine Bereicherung war.

Unserer Laborspezialistin Monika Erl bin ich für die Unterweisung und Unterstützung, nicht nur in labortechnischen Angelegenheiten, sehr zu Dank verpflichtet.

Sehr dankbar bin ich des Weiteren für die Beteiligung des Institutes für Epidemiologie und Präventivmedizin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Leitzmann. Die unkomplizierte und zuverlässige Unterstützung über die gesamte Dauer des Projektes von Frau PD Dr. Gundula Behrens hat die Arbeit sehr bereichert.

Auch Herrn Wolfgang Huber möchte ich für die schnelle und unkomplizierte Bereitstellung der Einträge der Biodatenbank danken.

Dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Gessner und insbesondere dem Team der Virologie bin ich für die ausgezeichnete Atmosphäre während meiner Labortätigkeiten sehr verbunden.

Schließlich gilt mein Dank noch Benedikt und meiner Familie, die mich immer unterstützen und an mich glauben.