

## ***Abschlussbericht Teilprojekt 9***

**Projekttitle:** Lebertransplantation bei viraler Hepatitis

**Projektleiter:** Prof. Dr. med. Michael P. Manns  
Medizinische Hochschule Hannover  
Zentrum für Innere Medizin  
Carl-Neuberg-Str. 1  
30625 Hannover

**Telefon:** +49 (0) 511 / 532-3305

**Fax:** +49 (0) 511 / 532-4896

**E-Mail:** manns.michael@mh-hannover.de, chi2@medizin.uni-leipzig.de

**Berichtszeitraum:** 01.02.2005 – 31.01.2007

## I. Kurze Darstellung

### 1. Aufgabenstellung

Die Hepatitis-B-Reinfektionsprophylaxe nach Lebertransplantation ist eine etablierte Therapie. Auch die Nutzung von Organen antiHBc positiver Spender und die in diesen Fällen durchgeführte Reinfektionsprophylaxe sind bereits erforscht.

Die Prävalenz okkulten HBV Infektionen bei Patienten, die eine Organtransplantation erhalten, ist jedoch unklar. Ob eine prophylaktische Therapie von Patienten mit serologisch ausgeheilten Hepatitis B Virusinfektion (antiHBc positiv und HBsAg negativ) nach Transplantation notwendig ist, und wenn, wie diese durchgeführt werden sollte, ist bisher nur unzureichend geklärt.

In dem Projekt sollte daher untersucht werden, ob es nach Organtransplantation von Patienten mit ausgeheilten Hepatitis B Virusinfektion zu einer HBV Reaktivierung kommen kann und wenn ja, welche pathophysiologischen Ursachen dafür verantwortlich sind.

### 2. Voraussetzungen

Zusammenarbeit zwischen verschiedenen Disziplinen (Transplantationschirurgie/ Gastroenterologie).

### 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

#### ***Klinik: retrospektive Datenauswertung:***

1. Zunächst soll durch eine Auswertung der Datenbanken unseres Zentrums geklärt werden, ob es in unserer Patientenkollektive HBV Reaktivierungen nach Leber- und Nierentransplantation bei Patienten mit serologisch ausgeheilten Hepatitis B Virusinfektion gibt.
2. Ferner sollte anhand der antiHBs Antikörpertiterverläufe untersucht werden, ob es bei Patienten nach Organtransplantation zu Veränderungen in der humoralen Immunität als mögliches Korrelat einer HBV Reaktivierung kommt.

#### ***Virologische Untersuchungen:***

1. durch eine nested-PCR in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und
2. durch eine realtime-HBV PCR aus dem Serum von antiHBc positiven / HBsAg negativen Patienten vor und nach Lebertransplantation soll untersucht werden, ob ein HBV DNA Nachweis in PBMC und oder im Serum gelingt und damit eine okkulte HBV Infektion nachgewiesen werden kann.

#### ***Immunologische Untersuchungen:***

An PBMC von antiHBc positiven / HBsAg negativen Patienten vor und nach Lebertransplantation sollte mit verschiedenen immunologischen Methoden untersucht werden, ob eine HBV spezifische zelluläre Immunantwort nach Lebertransplantation persistiert.

### 4. Wissenschaftlicher Stand

Die notwendige Immunsuppression nach Organtransplantation hat einen ungünstigen Einfluss auf den Verlauf einer HBV Infektion.

Bei nierentransplantierten, HBsAg-positiven Patienten haben Langzeitstudien eine durch ihre Lebererkrankung bedingte reduzierte Überlebensrate gezeigt. Eine Therapie mit Interferon- $\alpha$  ist nur selten erfolgreich, kann zur Organabstoßung führen und wird deshalb nicht empfohlen. Lamivudin ist in diesem Patientenkollektiv sicher und effektiv. Bei Resistenzentwicklung stellt Adefovir eine Alternative dar, aufgrund der Nephrotoxizität muss aber die Nierenfunktion engmaschig kontrolliert werden.

Bei fibrosierender cholestatischer Hepatitis ist bei nierentransplantierten Patienten - im Gegensatz zu lebertransplantierten Patienten - ein Langzeitansprechen auf Lamivudin beschrieben worden.

Ähnlich wie bei nierentransplantierten Patienten ist das Langzeitüberleben HBsAg-positiver, herztransplantierten Patienten ab der zweiten Dekade nach Transplantation reduziert. Eine Übersicht verschiedener HBV Risikokonstellationen bei Organtransplantation zeigt Tabelle 1.2.

Generell sollten alle Organempfänger, die keine Immunität aufweisen bzw. HBsAg-Träger sind, gegen HBV geimpft werden .

**Sonderfall antiHBc positive Organspender**

Organe von antiHBc positiven Spendern kommen bei dem heutigen Spenderorganmangel grundsätzlich für eine Transplantation in Betracht. Bei Herz- oder Nierentransplantation ist eine HBV Infektion des Empfängers im klinischen Verlauf sehr selten, bei Lebertransplantation jedoch bis zu 80% weshalb eine HBV Infektionsprophylaxe mit HBIg des Empfängers erforderlich ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem kürzlich zeigen, dass die Übertragung von HBV Antigenen auch bei Transplantierten von antiHBc positiven/ HBsAg negativen nicht hepatischen Organen möglich ist.

**Tab. I:** HBV Risikokonstellationen bei Organtransplantation

Tx-Organ	Spender		Empfänger		Risiko (Referenzen)
	HBsAg	antiHBc	HBsAg	antiHBc	
	+	+	+	+	Transplantation nur auf Pat. mit chronischer HBV
<b>Leber</b>	-	-	+	+	80-100% > Reinfektionsprophylaxe mit HBIg und Lamivudin (Roche B [71]; Samuel D [72])
	-	+	-	-	bis 80% > Reinfektionsprophylaxe mit HBIg und Lamivudin (Dickson RC [80]; Dodson SF [81]; Lok A [73])
	-	-	-	+	<1%, jedoch wenig Daten (Knöll A [115], Abdelmalek MF [117], Durhart BT [114])
	+	+	+	+	Transplantation nur auf Patienten mit chronischer HBV
<b>Niere, Herz, Lunge</b>	-	-	+	+	Standardtherapie der chronischen HBV ohne (PEG-) IFN-α, wegen Gefahr der Abstoßung (Tillmann HL [35])
	-	+	-	-	Selten, bevorzugt geimpfte Empfänger (Natov SN [79]; Fytilli [82])
	-	-	-	+	<1%, wenig Daten (Knöll A [115], Abdelmalek MF [117], Durhart BT [114])

**5. Okkulte Hepatitis B Virusinfektion**

Die langjährige Persistenz von HBV DNA im Lebergewebe (und Serum) von Patienten mit ausgeheilter Hepatitis B Virusinfektion (serologisch: antiHBc positiv HBsAg negativ) wird als okkulte HBV Infektion bezeichnet. Sie ist bedingt durch die intrahepatische Persistenz von HBV cccDNA und einer starken Suppression der viralen Replikation und Genexpression. Die Stabilität und Persistenz der viralen cccDNA zusammen mit der langen Lebenszeit von Hepatozyten lassen vermuten, dass eine HBV Infektion lebenslang erhalten bleibt. Der für die Entstehung und Persistenz der okkulten HBV verantwortliche Mechanismus ist nicht endgültig geklärt.

Es wird vermutet, dass die zelluläre Immunantwort, Virusinterferenzen bei Koinfektionen (vor allem mit HCV) und bestimmte epigenetische Mechanismen einen Einfluss haben [90].

Warum bei Patienten mit okkulten HBV Infektion kein HBsAg nachgewiesen werden kann, ist nicht endgültig geklärt, wird aber am ehesten auf die starke Suppression der viralen Replikation und Genexpression zurückgeführt.

Entsprechend den Risiken der HBV Infektion und der oben angegebenen Mechanismen in der Entstehung liegt eine besonders hohe Prävalenz bei HCV- und HIV-koinfizierten Patienten, i.v. Drogenabhängigen, Haemophilie- und Dialysepatienten vor.

Der Nachweis von HBV DNA ist aufgrund der im Serum sehr niedrig vorliegenden HBV DNA Mengen typischerweise nur mit hochsensitiven und spezifischen molekularbiologischen Methoden möglich. Intraindividuelle Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten zeigen eine höhere Identifikationsrate der okkulten HBV Träger.

Die Inhibition der Virusreplikation ist als reversibel anzusehen, weshalb die okkulte HBV Infektion in bestimmten Situationen reaktivieren kann und zu schwere, in Einzelfällen sogar fulminante Hepatitis B Verläufen führt. Dieses ist ebenfalls beschrieben für Übertragungen einer okkulten HBV Infektion durch Bluttransfusionen oder Organtransplantation.

Die langanhaltende Viruspersistenz in der Leber mag zwar alleine wenig pathogene Relevanz haben, unterhält möglicherweise aber eine leichte, jedoch beständige nekroinflammatorische Komponente, welche zusammen mit weiteren hepatotoxischen Kofaktoren zu einer Progression der chronischen Lebererkrankung und letztendlich zur Zirrhose führen kann.

Die okkulte HBV Infektion scheint die proonkogene Wirkung einer chronischen HBV Infektion aufrecht zu erhalten und ist nachweislich ein Risikofaktor für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms.

Diese Erkenntnisse zeigen die hohe klinische Relevanz der okkulten Hepatitis B. So sind Patienten mit einer okkulten HBV Infektion bei immunsupprimierender Behandlung, immunkompromittierenden Erkrankungen oder bei Vorliegen einer Leberzirrhose extrem gefährdet, eine HBV Reaktivierung und ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln.

## II Eingehende Darstellung

### 1. zu den erzielten Ergebnissen

#### Ergebnisse der Datenbankauswertung

##### Reaktivierung einer „ausgeheilten“ Hepatitis B Infektion

Die statistische Auswertung erfolgte aus Datenbanken der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie und der interdisziplinären Leber- und Nierentransplantationsambulanz. Insgesamt konnten aus diesen Datenbanken 201 Patienten mit serologisch nachweisbarem Kontakt zum Hepatitis B Virus (antiHBc positiv, HBsAg negativ) identifiziert werden, von denen 101 leber- und 86 nierentransplantiert waren. 14 ebenfalls antiHBc positive, HBsAg negative Patienten waren auf der Warteliste für ein Organ. Keiner dieser identifizierten Patienten erhielt eine antivirale Therapie gegen Hepatitis B. 56 transplantierte Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation HBsAg positiv waren und somit also eine chronische Hepatitis B hatten, wurden aus den weiteren Auswertungen ausgeschlossen.

Es konnten außerdem insgesamt vier Patienten identifiziert werden, die zum Zeitpunkt der Transplantation HBsAg negativ und anti HBc positiv waren aber im weiteren Verlauf eine aktive Hepatitis B Infektion mit positivem HBsAg entwickelten. Zwei dieser Patienten waren leber-, die anderen beiden nierentransplantiert. Diese Ergebnisse sprechen für eine Reaktivierung der zum Zeitpunkt der Transplantation serologisch ausgeheilten Hepatitis-B-Infektion mit erneut nachweisbarer Virusreplikation nach Transplantation.

Der Nachweis von HBsAg im Serum erfolgte bei den beiden lebertransplantierten Patienten 8 beziehungsweise 9 Monate nach der Transplantation. Bei den nierentransplantierten Patienten war erstmals 12 beziehungsweise 24 Monaten post transplantationem ein positiver HBsAg Titer nachweisbar. Allerdings wurden nach Nierentransplantation nur alle 12 Monate die Hepatitisserologien bestimmt. Klinisch fiel einer dieser Patienten (lebertransplantiert) mit einem akuten Krankheitsbild mit deutlichem Anstieg der Transaminasen und einem Ikterus

auf, so dass der Patient bei Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion stationär aufgenommen wurde und zur weiteren Abklärung auch eine Hepatitisserologie bestimmt worden war. Zwei der Patienten fielen bei der Routinebestimmung der Hepatitisserologie auf und hatten weder erhöhte Transaminasen noch einen Ikterus. Bei einem weiteren lebertransplantierten Patienten waren die Leberwerte nur leicht erhöht (Transaminasen 2-3fach über die Norm erhöht). Drei der Patienten erhielten nach der Diagnosestellung Lamivudine als Therapie, einer eine kombinierte Therapie mit Lamivudine und Adefovir.

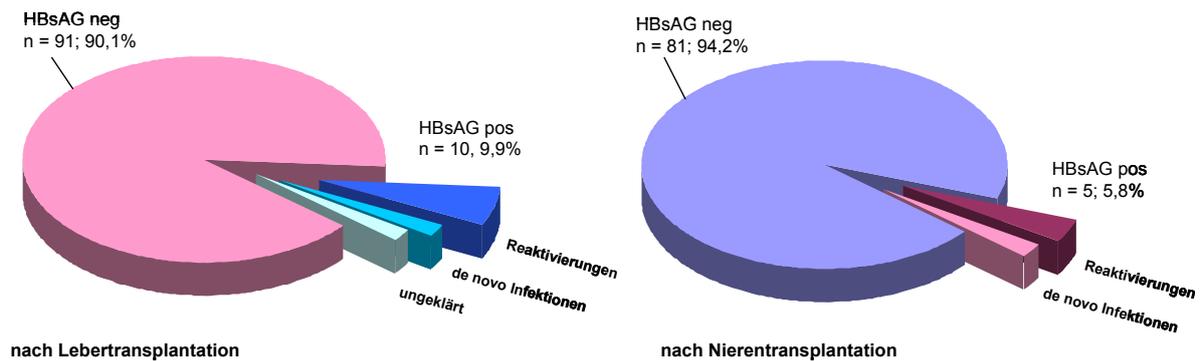
Alle vier Patienten mit HBV-Reaktivierungen waren aufgrund von Abstoßungsreaktionen mit zum Teil mehreren Steroid-Boli behandelt worden, bevor es zum Auftreten der Hepatitis B Virusinfektion kam. Somit muss die erhöhte Immunsuppression als ein Risikofaktor für das Auftreten der Reaktivierung diskutiert werden. Neben den vier Reaktivierungen konnten außerdem 9 transplantierte Patienten (6 lebertransplantiert, 3 nierentransplantiert) identifiziert werden, die vor der Transplantation antiHBc negativ waren und im weiteren Verlauf nach der Operation eine de novo Hepatitis B Virusinfektion entwickelt haben.

### Hepatitis C Virus Koinfektion als möglicher Risikofaktor für eine HBV Reaktivierung

Bei drei der vier Patienten, bei denen eine Hepatitis B Reinfektion diagnostiziert werden konnte, lag eine Koinfektion mit dem Hepatitis C Virus vor (75%). Zum Vergleich lag die Inzidenz für eine chronische Hepatitis C Virusinfektion in der Gruppe der Patienten, die keine HBV-Reaktivierung nach Transplantation aufwiesen, signifikant niedriger (45 von 187,  $p=0,024$ ). Lebertransplantierte waren zu 27% und Nierentransplantierte zu 21% anti-HCV negativ. Eine chronische Hepatitis C Virusinfektion könnte also neben einer Abstoßungsbehandlung mit Steroidboli ein Risikofaktor für eine HBV-Reaktivierung darstellen.

**Tab. II:** Charakteristika der Patienten mit HBV-Reaktivierung nach Transplantation

<b>Tx-Organ</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>HCV - RNA</b>	<b>initiale IS</b>	<b>Umstellung IS</b>	<b>Besonderheiten</b>	<b>Grund-erkrankung</b>	<b>Zeit Reakt.</b>
Leber	männlich	55,7	-	CsA/Steroide	keine	Steroidrejektions-Behandlung	Alkoholische LZ	9
Leber	männlich	48,3	+	CsA/Steroide	keine	Steroidrejektions-Behandlung	chronische HCV	8
Niere	männlich	54,1	+	Aza/Steroide	MMF/Steroide	Steroidrejektions-Behandlung	zystische Nierenerkrankung	12
Niere	weiblich	41,6	+	CsA/Steroide/MMF	Tac/Steroide/MMF	Steroidrejektions-Behandlung	chronische Pyelonephritis	24



**Abb. II a:** HBV Reaktivierungen nach Leber- und Nierentransplantation

Bei 2 von 101 (2%) lebertransplantierten und bei 2 von 86 (2,3%) nierentransplantierten Patienten konnte eine Reaktivierung der „ausgeheilten“ Hepatitis B nachgewiesen werden. Bei 2 lebertransplantierten war der antiHBc-Status zum Zeitpunkt der LTX unbekannt.

### Verlauf der antiHBs Titer nach Transplantation

Zum Zeitpunkt der Transplantation konnte bei einem Drittel der antiHBc positiven Lebertransplantierten ein positiver antiHBs-Titer gefunden werden, bei einem weiteren Drittel aller Patienten konnte zum Zeitpunkt der Transplantation kein antiHBs-Titer nachgewiesen werden. Bei dem letzten Drittel der Patienten waren keine Daten zum Transplantationszeitpunkt eruiert. 3 der 4 oben genannten Patienten mit einer HBV-Reaktivierung hatten zum Zeitpunkt der Transplantation keinen nachweisbaren antiHBs-Titer.

Um zu untersuchen, ob die antiHBs Titer einen Einfluss auf eine mögliche Reaktivierung einer ausgeheilten Hepatitis B nach Transplantation haben, wurden von insgesamt zehn Patienten exemplarisch die antiHBs Titerverläufe nach Lebertransplantation analysiert. Keiner dieser Patienten hatte eine aktive oder passive HBV-Immunsierung nach der Transplantation erhalten.

Bei allen untersuchten Patienten zeigte sich ein deutlicher Abfall von antiHBs in den ersten 22 Wochen nach der Transplantation, bei drei dieser Patienten war antiHBs nach diesem Zeitraum nicht mehr nachweisbar. Der Abfall von antiHBs zeigte keine Korrelation zum Alter der Patienten oder zu der verwendeten Immunsuppression.

Grundsätzlich zeigen diese prospektiven Daten einen negativen Einfluss der Immunsuppression auf die humorale HBV-spezifische Immunantwort, die zu einem Verlust von protektiven antiHBs Titern bei der Mehrzahl der Patienten führt.

### Virologischen Untersuchungen

#### HBV DNA in peripheren mononukleären Blutzellen nach Lebertransplantation

Mittels einer nested PCR wurden periphere mononukleären Blutzellen (PBMC) von insgesamt 25 lebertransplantierten Patienten mit den serologischen Markern einer ausgeheilten Hepatitis B Virusinfektion isoliert und auf HBV DNA untersucht. Weitere Charakteristika dieser Patientenkohorte finden sich im Kapitel, Tabelle 3.1. Bei insgesamt fünf transplantierten Patienten (20%) konnte in einem Zeitraum von bis zu 75 Monaten nach Transplantation HBV DNA in den PBMC nachgewiesen werden. Keiner dieser Patienten war zum Untersuchungszeitpunkt HBsAg positiv. Auffallend war auch hier, dass von diesen fünf Patienten vier eine chronische Hepatitis C Virusinfektion hatten (80%). Im Serum ließ sich zeitgleich lediglich bei zwei der fünf Patienten HBV DNA nachweisen.

### **HBV DNA Nachweis im Serum nach Lebertransplantation**

Neben den peripheren mononukleären Blutzellen wurde zusätzlich das Serum von diesen antiHbC positiven HBsAg negativen Patienten auf HBV-DNA untersucht. Hierfür standen uns von insgesamt 17 der 25 lebertransplantierten Patienten eingefrorene Serumproben zur Verfügung, welche vor der Transplantation gewonnen wurden. Aus diesen Proben konnte insgesamt bei sieben Patienten HBV-DNA nachgewiesen werden (41%).

Von 17 dieser 25 lebertransplantierten Patienten standen außerdem eingefrorene Serumproben, welche in einem Zeitraum von rund 14 Tagen nach Transplantation gewonnen wurden, zu unserer Verfügung. Aus diesen Proben konnte bei insgesamt 13 Patienten HBV-DNA nachgewiesen werden (76%).

Außerdem wurde bei allen diesen Patienten das letzte verfügbare Serum untersucht, das bis 170 Monate nach der Lebertransplantation abgenommen worden war. In diesen Serumproben konnte in 6 von 25 Proben (23%) HBV-DNA nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte bei insgesamt 17 von 25 (68%) antiHbC positiven / HBsAg negativen Patienten vor und / oder nach Lebertransplantation (bis ca. 170 Monaten nach LTX) niedrige Spiegel von HBV-DNA mit Hilfe der quantitativen TaqMan®-real-time-PCR im Serum nachgewiesen werden (Median: 2025 IU/ml,  $\pm 1410$  IU/ml). Die Nachweisgrenze der TaqMan-real-time-PCR lag bei 6 IU/ml.

Vergleicht man die Patienten mit einer chronisch replikativen Hepatitis C Virusinfektion mit denen ohne HCV-Nachweis, so ließen sich bei 11 der 14 HCV-positiven Patienten (79%) HBV-DNA im Serum oder in den PBMC nachweisen. Bei den 11 HCV-negativen Patienten konnte im Serum oder PBMC von sechs Patienten (55 %) HBV-DNA gefunden werden. Es zeigte sich also beim HBV-DNA Nachweis im Serum kein signifikanter Unterschied zwischen den HCV positiven und –negativen Patienten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich auch noch nach Jahren in peripheren Blutzellen HBV-DNA nachweisen lässt, obwohl das primäre Zielorgan einer HBV-Infektion – die Leber – explantiert worden ist.

### **Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen**

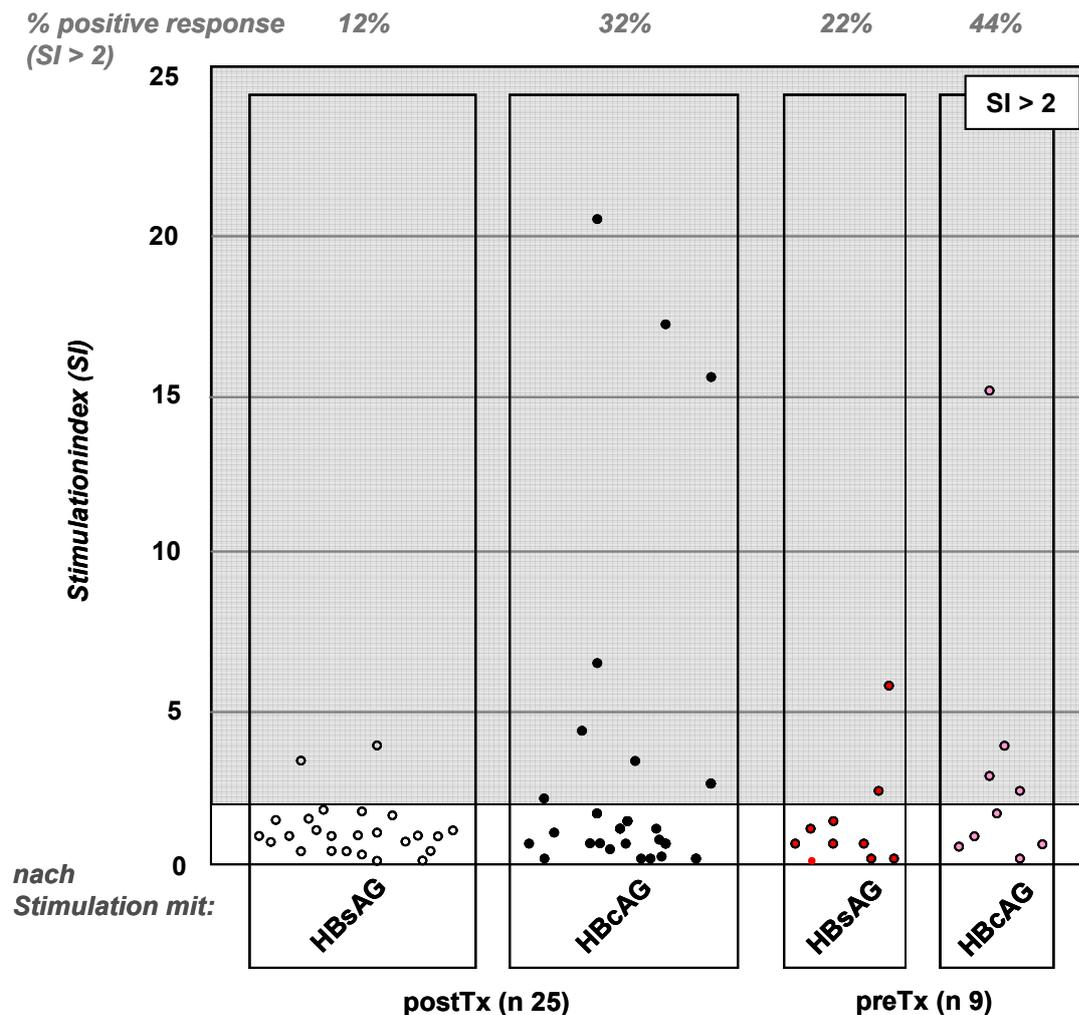
#### **Spezifische Proliferation in der okkulten Hepatitis B**

Um die HBV spezifische T-Zell-Proliferation zu untersuchen, wurde bei insgesamt 20 transplantierten Patienten und 6 nicht transplantierten Patienten ein Proliferationstest durchgeführt und der antigenspezifische Stimulationsindex berechnet. Ein Stimulationsindex  $> 2,0$  wurde als signifikant gewertet, basierend auf anderen Patientenkohorten, die in der Arbeitsgruppe Wedemeyer untersucht worden waren. Insgesamt ließ sich bei 2 von 25 (12%) lebertransplantierten Patienten eine signifikante Proliferation nach Stimulation mit HBsAg nachweisen (Abbildung 4.5). Es ließ sich zwischen der Gruppe der Patienten mit Nachweis von HBV DNA im Serum und ohne HBV-DNA Nachweis kein signifikanter Unterschied in der Proliferation nachweisen. Als Kontroll- und Vergleichsgruppe dienten die PBMC von 9 nicht transplantierten, antiHbC positiven Patienten, die keine Immunsuppression erhielten. Hier ließ sich bei zwei Patienten (22%) nach Stimulation mit HBsAg eine signifikante Proliferation nachweisen.

Nach Stimulation mit HBcAg ließ sich bei 8 von insgesamt 25 getesteten transplantierten Patienten (32%) eine signifikante spezifische Proliferation nachweisen. Es zeigten sich weder deutliche Unterschiede zwischen Transplantierten und Nicht-Transplantierten noch zwischen HBV-DNA positiven und HBV-DNA negativen Patienten.

Bei insgesamt 10 von 25 transplantierten Patienten (40%) ließ sich mindestens eine positive Antwort auf eines der Antigene nachweisen. Bei den Nicht-transplantierten haben insgesamt 4 von 9 Patienten (44%) auf eines der Antigene reagiert.

Insgesamt ließ sich keine Korrelation von HBV-spezifischen Proliferationsantworten mit Nachweis von HBV-DNA, HCV-Status oder Immunsuppression nachweisen.



**Abb. II b:** Ergebnisse des Proliferationsassay:  
Zur Bestimmung der HBV-spezifischen Proliferation wurde bei lebertransplantierten und nicht-transplantierten Patienten ein Proliferationsassay durchgeführt. Es ließ sich eine signifikante Stimulation (SI >2) bei 15% (HbsAg) bzw. 26% (HbcAg) nachweisen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen.

### Hochregulation von CD25 (IL-2 Rezeptor) auf CD4+ Zellen

Mittels Durchflusszytometrie wurde in unseren Untersuchungen die Regulation des IL2-Rezeptors auf CD4+ T-Lymphozyten untersucht, da mittels Stimulation mit HBV-Proteinen vor allem CD4+ T-Zellen aktiviert werden. Aus den Ergebnissen der CD25-Hochregulation wurden ebenfalls Stimulationsindices nach oben angegebener Formel errechnet. Ein Stimulationsindex > 2,0 wurde als signifikant gewertet. Insgesamt ließ sich bei 4 von 25 (16%) lebertransplantierten Patienten eine signifikante Hochregulation des Interleukin-2 Rezeptors nach Stimulation mit HBsAg nachweisen. Nach Stimulation mit HbcAg ließ sich bei 5 von insgesamt 25 untersuchten transplantierten Patienten (20%) eine signifikante CD25-Hochregulation nachweisen. Es ließ sich zwischen der Gruppe der Patienten mit Nachweis von HBV DNA im Serum und ohne HBV-DNA Nachweis kein signifikanter Unterschied in der Proliferation nachweisen.

Als Kontroll- und Vergleichsgruppe dienten die PBMC von 9 nicht transplantierten, antiHbc positiven Patienten, die keine Immunsuppression erhielten. Hier ließ sich bei einem Patienten (11%) nach Stimulation mit HBsAg und bei zwei Patienten (22%) nach Stimulation mit HbcAg eine signifikante Proliferation nachweisen.

Bei insgesamt 7 von 25 transplantierten Patienten (28%) ließ sich mindestens eine positive Antwort auf eines der Antigene nachweisen. Bei den Nicht-transplantierten haben insgesamt 3 von 9 Patienten (33%) auf eines der Antigene reagiert.

Insgesamt ließ sich keine Korrelation von der HBV-spezifischen CD25-Hochregulation auf CD4 positiven Zellen mit dem Nachweis von HBV-DNA, dem HCV-Status oder der Immunsuppression nachweisen.

### **HBV-spezifische Zytokinproduktion**

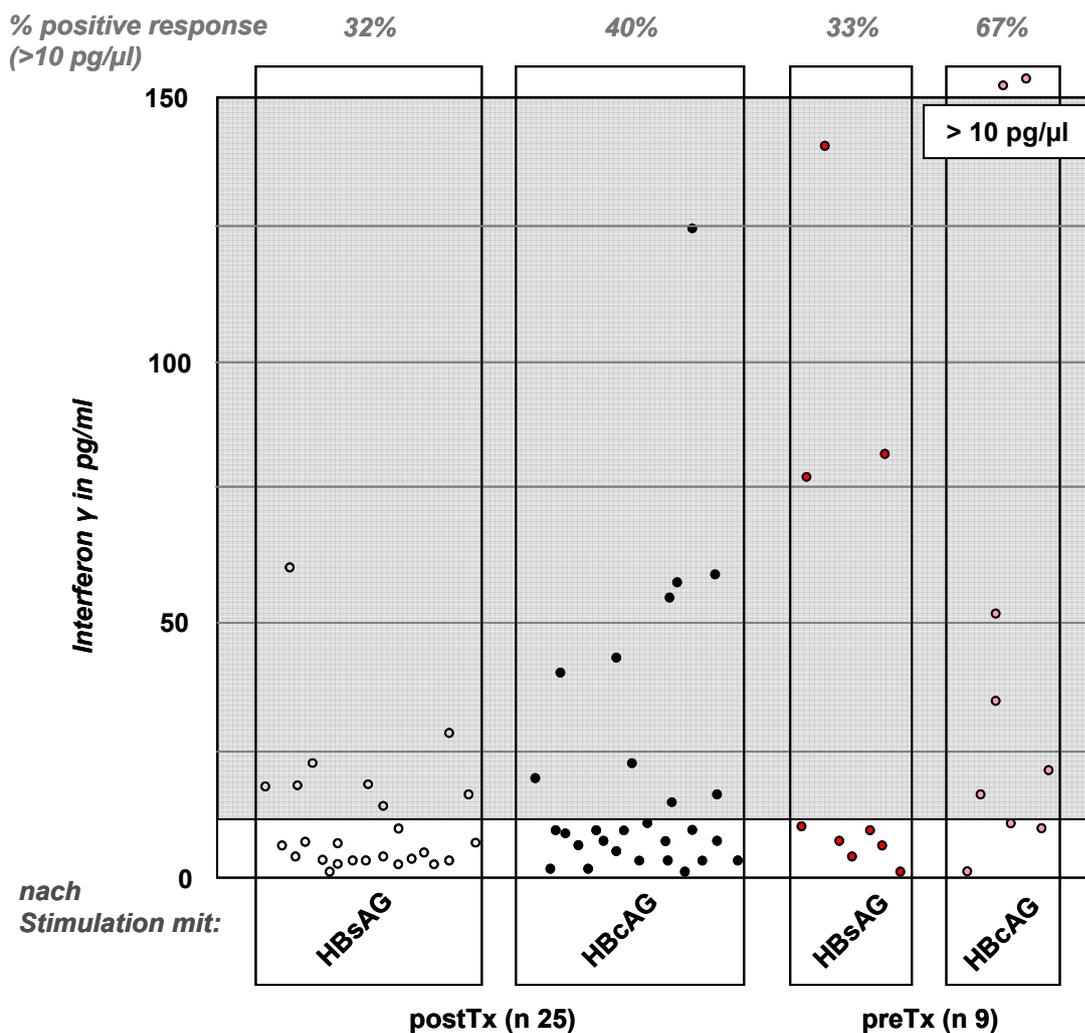
Mittels ELISA wurden HBV-spezifische Zytokinproduktionen bei antiHBc positiven/ HbsAg negativen Patienten untersucht. Wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, wurde ein „cut-off“ für eine positive Immunantwort für IL2, IL10 und IFN $\gamma$  bei 10 pg/ $\mu$ l angesetzt. Auch hier wurden jeweils nicht transplantierte Patienten ohne Immunsuppression als Vergleichsgruppe untersucht.

### **Interferon $\gamma$ Sekretion nach antigenspezifischer Stimulation**

Bei insgesamt 8 von 25 lebertransplantierten Patienten (32%) ließ sich nach 5-tägiger Stimulation mit HBsAg eine signifikante Sekretion von Interferon  $\gamma$  nachweisen. Unterschiede zwischen Patienten mit positivem Nachweis von HBV-DNA im Serum und Patienten ohne HBV-DNA ergaben sich nicht. In der Vergleichsgruppe der Nicht-transplantierten zeigte sich bei 40% der Patienten eine signifikante Interferon  $\gamma$ -Sekretion nach Stimulation mit HBsAg, so dass es zwischen diesen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied gab. Nach Inkubation mit HBcAg zeigte sich bei 10 von 25 getesteten, transplantierten Patienten (40%) eine signifikante Interferon  $\gamma$ -Sekretion. Ebenfalls bestanden keine Unterschiede zwischen HBV-DNA positiven und HBV-DNA negativen Patienten. Bei der Kontrollgruppe lag die Interferon  $\gamma$ -Sekretion bei 67%.

Bei insgesamt 14 von 25 transplantierten Patienten (56%) ließ sich mindestens eine positive Antwort auf eines der Antigene nachweisen. Bei den Nicht-transplantierten haben insgesamt 6 von 9 Patienten (66%) auf eines der Antigene reagiert.

Insgesamt ließ sich keine Korrelation von der HBV-spezifischen Interferon- $\gamma$  Sekretion mit dem Nachweis von HBV-DNA, dem HCV-Status oder der Immunsuppression nachweisen.



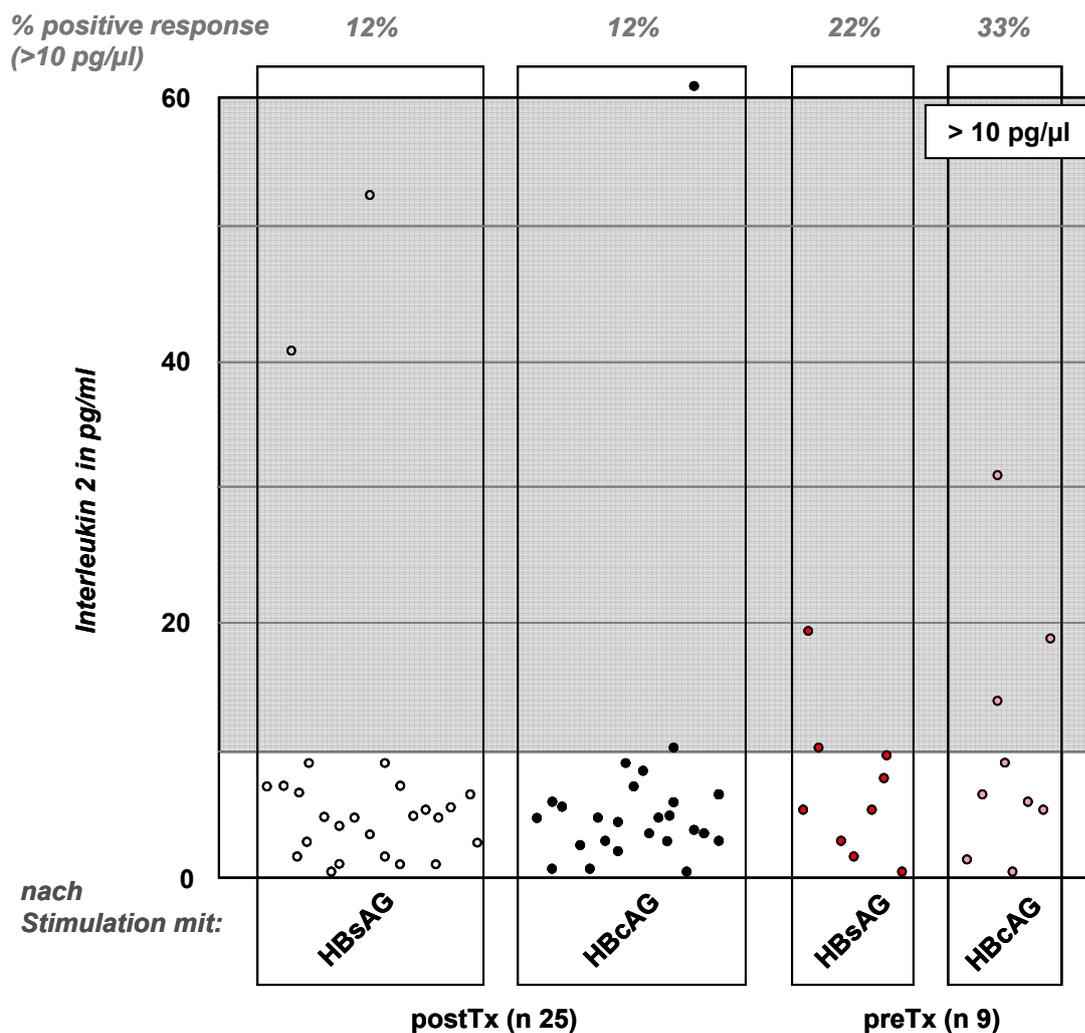
**Abb. II c :** Ergebnisse ELISA Interferon  $\gamma$ -Sekretion nach Antigenstimulation  
Die Interferon  $\gamma$ -Sekretion wurde im ELISA nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen bestimmt. Eine Sekretion von  $>10$  pg/ $\mu$ l wurde als signifikant definiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen transplantierten und nicht-transplantierten Patienten oder zwischen HBV DNA positiven und HBV DNA negativen Patienten.

#### 4.3.3.2 Interleukin 2 Sekretion nach antigenspezifischer Stimulation

Nach 5-tägiger Stimulation der PBMC von antiHBc+ HbsAg- lebertransplantierten Patienten mit HBsAg ließen sich bei 12% (3 von 25) eine signifikante Interleukin 2 Sekretion nachweisen. Es bestanden keine Unterschiede zwischen HBV DNA positiven und HBV DNA negativen Patienten. Bei den nicht transplantierten Patienten ohne Immunsuppression lag der Prozentsatz der Patienten mit signifikanter IL 2 Sekretion bei 22%. Verwendete man HbcAg als Antigen, ließ sich ebenfalls bei 12% der transplantierten (3 von 25) Patienten eine signifikante IL 2 Sekretion nachweisen, in der Gruppe der nicht transplantierten waren es 3 von 9 Patienten (33%). Aufgrund der geringen Fallzahl lassen sich keine sicher signifikanten Unterschiede nachweisen, auch wenn tendenziell die IL2 Sekretion bei Patienten unter Immunsuppression geringer war.

Bei insgesamt 6 von 25 transplantierten Patienten (24%) ließ sich mindestens eine positive Antwort auf eines der Antigene nachweisen. Bei den Nicht-transplantierten haben insgesamt 3 von 9 Patienten (33%) auf eines der Antigene reagiert.

Insgesamt ließ sich keine signifikante Korrelation von der HBV spezifischen Interleukin 2 Sekretion mit dem Nachweis von HBV DNA, dem HCV Status oder der Immunsuppression nachweisen.



**Abb. II d:** Ergebnisse ELISA Interleukin 2-Sekretion nach Antigenstimulation: Die Interleukin 2-Sekretion wurde im ELISA nach Stimulation mit verschiedenen Antigenen bestimmt. Eine Sekretion von >10 pg/µl wurde als signifikant definiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen transplantierten und nicht-transplantierten Patienten oder zwischen HBV DNA positiven und HBV DNA negativen Patienten

## 2. Voraussichtlicher Nutzen der Ergebnisse

Endogene Reaktivierungen einer serologisch „ausgeheilten“ Hepatitis B nach Leber- und Nierentransplantation und unter Immunsuppression sind möglich aber selten.

Nach „ausgeheilten“ Hepatitis B liegt häufig (immer?) eine „okkulte“ Hepatitis B, im Sinne von nachweisbarer HBV DNA im Serum, peripheren Blutzellen und Lebergewebe vor.

Eine HBV spezifische zelluläre Immunantwort lässt sich nach „ausgeheilten“ Hepatitis B auch viele Jahre nach Lebertransplantation und ohne simultan nachweisbare Viruslast nachweisen.

Die okkulte Hepatitis B unterstützt möglicherweise die Ausbildung und Unterhaltung der HBV spezifische zellulären Immunität. Diese wiederum könnte die niedrige Frequenz der HBV Reaktivierungen trotz persistierendem Vorliegen von HBV DNA in HBsAg negativen anti Hbc positiven Patienten erklären.

Die Gabe von Hepatitis B Immunglobulin ist unserer Meinung nach nicht nötig, auch wenn die antiHBs Titer nach Transplantation deutlich abfallen, da das Risiko einer HBV Reaktivierung lediglich bei circa 2 % liegt. Stattdessen sollte zuvor mehrmals auf HBV DNA getestet werden. Wenn HBV DNA nachweisbar ist, stellt dies ebenfalls keine Indikation für eine passive Immunisierung dar. Stattdessen kann man diese Patienten entweder aktiv impfen, allerdings ist der Erfolg nach unseren Erfahrungen eher fraglich unter

Immunsuppression. Entscheidend ist vielmehr, dass im Falle einer nachweisbaren HBV Replikation eine prophylaktische Gabe von Nukleosid- oder Nukleotidanaloga erfolgt, die effektiv eine HBV Reaktivierung hemmen können.

Wenn bei diesen Patienten jedoch mehrmals keine HBV DNA nachweisbar ist, ist ein abwartendes Verhalten gerechtfertigt.

Mit diesem Schema wird man wahrscheinlich ein Restrisiko nicht verhindern können. Allerdings bestehen bei einer Hepatitis B Virusinfektion heute vielfältige Behandlungsmöglichkeiten und es steht ein Portfolio an Medikamenten wie Lamivudin, Adefovir, Tenofovir, Entecavir und in Kürze auch Telbivudin zur Verfügung, so dass dementsprechend durch sequentielle oder Kombinationstherapie verschiedene Resistenzmuster verhinderbar sind und eine erfolgreiche Therapie auch nach Transplantation sehr gut möglich ist.

### **3. Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen**

Keine.

### **4. Veröffentlichungen der Ergebnisse**

Die Ergebnisse dieser Studie sind zur Publikation beim Journal of infectious diseases angenommen worden und werden unter dem Titel: „Persistence of occult hepatitis B after removal of the Hepatitis B Virus-infected liver“ veröffentlicht.