

**Diplomarbeit**

**Impfantwort auf Hepatitis B und Mortalität bei  
Dialysepatienten**

eingereicht von

**Alexander Herr**

Geb.Dat.: 30.09.1984

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinik für Nephrologie und Dialyse**

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr. med. univ. Alexander Rosenkranz**

**Ass. Dr. Hildegard Hafner-Gießauf**

## Impfantwort auf Hepatitis B und Mortalität bei Dialysepatienten

### *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

Graz, am 12.11.2013

Alexander Herr

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. A. Rosenkranz danken, dafür dass er es mir als Erstbetreuer ermöglicht hat diese Arbeit zu schreiben und sich hervorragend um alle organisatorische Sachen um die Diplomarbeit herum gekümmert hat und diese entsprechend vorantrieb.

Ebenfalls danke ich ganz herzlich Frau Dr. Hafner-Gießauf für ihre kompetente, freundliche und hervorragende Betreuung. Sie hatte immer Zeit für mich übrig und half überall, wo sie konnte. Eine bessere Betreuung hätte man sich nicht wünschen können.

Auch den Kollegen vom Krankenhaus Feldkirch möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die statistische Auswertung der Daten danken.

Ganz besonders möchte ich meiner ganzen Familie dafür danken, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat. Ohne sie wäre es alles nicht möglich gewesen. Gesondert möchte ich an dieser Stelle meine kleine Schwester erwähnen, die mich stets als großes Vorbild ansah und ich versucht habe dem gerecht zu werden.

Ich möchte diese Diplomarbeit meiner Oma widmen, welche leider nicht mehr unter uns weilt. Sie wollte immer so gerne erleben, wie ich mein Diplom in den Händen halte und ein guter Arzt werde. Leider hat sie es nicht mehr geschafft, dennoch hoffe ich, dass sie stolz auf mich sein kann.

Und nicht zuletzt möchte ich auch meiner guten Bekannten Christiane, die für mich immer ein offenes Ohr hatte und mir mit konstruktiver Kritik und kompetenten Ratschlägen zur Seite stand, danken.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VII
Glossar und Abkürzungen .....	VIII
Zusammenfassung .....	IX
Abstract .....	XI
Einleitung .....	XIII
I Grundlagen .....	1
1 Mortalität bei Dialysepatienten .....	1
2 Hepatitis B .....	2
2.1 Epidemiologie .....	2
2.2 Klinischer Verlauf bei Dialysepatienten im Vergleich zu Nierengesunden .....	3
2.3 Übertragung .....	5
2.4 Prävention .....	6
3 Immunität .....	7
3.1 Immunabwehr von HBV beim Gesunden .....	7
3.2 Immunabwehr von HBV bei Niereninsuffizienz .....	8
3.3 Auslösende Faktoren für Immundefunktionsstörung bei Dialysepatienten .....	9
3.4 Ursachen für verminderte Impfantwort bei Dialysepatienten .....	10
4 Hepatitis B Impfung .....	12
4.1 Vakzine .....	12
4.2 Hepatitis B Impfung bei Dialysepatienten in Vergleich zu Gesunden .....	13
4.3 Impfstatus .....	14
4.4 Impfschema .....	15
4.5 Neuere Ansatzpunkte und Strategien bei der Hepatitis B Prophylaxe .....	17
II Material und Methoden .....	20
III Ergebnisse .....	23

1	Baseline-Charakteristika der Patienten .....	23
2	Impfschema .....	29
3	Überlebenskurven .....	29
IV	Diskussion .....	36
1	Hauptergebnisse .....	36
2	Limitationen der Studie .....	37
3	Ausblick .....	38
V	Literaturverzeichnis .....	39

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prävalenz von Hepatitis B unter Dialysepatienten (3).....	3
Abbildung 2: Klinische Verlaufsformen der HBV-Infektion (10) .....	4
Abbildung 3: Immunabwehr von HBV beim Gesunden und beim Patienten mit Niereninsuffizienz. (16).....	8
Abbildung 4: Einflussfaktoren auf die Ausreifung und Funktion immunkompetenter Zellen bei chronischer Niereninsuffizienz (3).....	10
Abbildung 5: Störung der zellulären Immunität bei chronischer Niereninsuffizienz (3).....	11
Abbildung 6: Hepatitis-B-impfung bei Dialysepatienten (16) .....	15
Abbildung 7: Überlebenskurve 1 ohne TPL-Zensur.....	31
Abbildung 8: Überlebenskurve 2 ohne TPL-Zensur.....	32
Abbildung 9: Überlebenskurve 3 mit TPL-Zensur.....	33
Abbildung 10: Überlebenskurve 4 mit TPL-Zensur.....	34

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung verschiedener Forschungsergebnisse über Hepatitis B Impfung bei Patienten mit chron. Niereninsuffizienz (40).....	16
Tabelle 2: Geschlechtsaufteilung nach Zentren .....	23
Tabelle 3: Erste NET .....	23
Tabelle 4: NET nach 3 Monaten.....	24
Tabelle 5: Überlebensstatus.....	24
Tabelle 6: dead or alive .....	25
Tabelle 7: Mortalität kardiovaskulär oder infektiös bedingt.....	25
Tabelle 8: Kardiovaskuläre Mortalität .....	26
Tabelle 9: Mortalität nach Infektion.....	26
Tabelle 10: Diabetes .....	27
Tabelle 11: Impfzeitpunkt .....	27
Tabelle 12: Einige Prädiktoren der Studie im Vergleich .....	28
Tabelle 13: Signifikanz der ausgewählten Prädiktoren.....	28
Tabelle 14: Impfschemata der Studie .....	29
Tabelle 15: berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 1 .....	30
Tabelle 16: nicht-berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 1 .....	30
Tabelle 17: berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 2 .....	31
Tabelle 18: nicht-berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 2.....	31
Tabelle 19: berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 3 .....	32
Tabelle 20: nicht-berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 3.....	33
Tabelle 21: berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 4 .....	34
Tabelle 22: nicht-berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 4.....	34

## Glossar und Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HD	Hämodialyse
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
NET	Nierenersatztherapie
NTX	Nierentransplantation
ÖDTR	Österreichisches Dialyse- und Transplantationsregister
PD	Peritonealdialyse
TPL-Zensur	Patienten, welche transplantiert wurden, werden bei der Studie nicht weiter beobachtet/zensiert (Studienende)

## Zusammenfassung

### Grundlagen

Aktuell bekommen weltweit über 1,5 Millionen Patienten/innen eine Nierenersatztherapie. Man geht davon aus, dass diese Zahl jährlich weltweit um 7% ansteigt. All diese Patient/innen werden nach internationalen Richtlinien aktiv gegen Hepatitis B immunisiert. Diese Immunisierung erfolgt nach einem standardisierten Impfschema. Dabei soll zur sicheren Wirksamkeit gegen Hepatitis B ein Impftiter von  $>100$  IU/ml erreicht werden. Dialysepatient/innen haben ein extrem hohes Mortalitätsrisiko von 10-15% pro Jahr. An erster Stelle stehen dabei kardiovaskuläre Ursachen gefolgt von Infektionen. Insgesamt sprechen nur etwa 60% aller Patient/innen mit chronischer Niereninsuffizienz auf die aktive Immunisierung gegen Hepatitis B an, bei Nierengesunden sind es etwa 90%. Die Impfantwort im Rahmen einer aktiven Immunisierung hängt von der Funktion von dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten ab und stellt daher einen Parameter zur integralen Messung der Funktion des Immunsystems dar. Eine gestörte Impfantwort ist somit Ausdruck einer Dysfunktion des Immunsystems.

### Studienhypothese

Anhand der gewonnenen Daten wollten wir untersuchen, ob eine verminderte Antikörperbildung im Rahmen der aktiven Hepatitis B Schutzimpfung mit einer erhöhten Mortalität bei Dialysepatient/innen assoziiert ist.

### Material und Methoden

Die Hypothese wurde anhand der retrospektiven Analyse von Impftiter und Mortalität von insgesamt 876 Patient/innen, die in den nephrologischen Zentren Feldkirch und Graz ins chronische Dialyseprogramm im Zeitraum vom 01.01.2001 bis 31.12.2008 aufgenommen wurden, untersucht.

### Ergebnisse

Aufgrund fehlender Datensätze bei manchen Patient/innen sind letztendlich nur 426 Patient/innen in die Studienwertung eingegangen. Dabei handelte es sich um solche, bei denen der HBsAK-Titer innerhalb 1 Jahres nach Immunisierung bestimmt wurde. Die Patient/innen wurden für die Erstellung von Überlebenskurven nicht zentrenspezifisch betrachtet. Es erfolgte separate Beurteilung der Mortalität bei Seroprotektion (d.h. Titer  $>100$  IU/ml) vs. No-

Seroprotektion sowie Serokonversion (d.h. Titer >10 IU/ml) vs. No-Serokonversion. Dabei konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Seroprotektion und Mortalitätsrate festgestellt werden ( $p=0,041$ ). Bei der Serokonversion verhielt es sich ähnlich, wenn auch nicht signifikant, aber der Trend war da ( $p=0,068$ ).

### Diskussion

Da es sich um eine retrospektive Analyse handelt, bestehen einige limitierende Faktoren in der Beurteilung der Studienergebnisse. Zu den wichtigsten zählen die alten Impfschemata (die aber zum damaligen Zeitpunkt durchaus üblich waren) sowie auch die unterschiedlich angewendeten Impfschemata an den jeweiligen Zentren. Außerdem ist zu erwähnen, dass der Impftiter als Variable angesehen wird, was statistisch nicht korrekt ist. Dennoch konnte unsere ursprünglich festgelegte Studienhypothese anhand der statistischen Auswertung bestätigt werden.

## Abstract

### Introduction

Nowadays more than 1.5 million patients undergo kidney replacement therapy worldwide. This number is expected to increase about 7% a year. All these patients are immunized actively against Hepatitis B in accordance with the international guidelines and with a standardized vaccination schedule. Vaccination titers of >100 IU/ml (seroprotection) should be achieved to ensure the effectiveness of the vaccination against Hepatitis B.

Dialysis patients show an extremely high risk of mortality of 10-15% a year. The main reason for that are cardiovascular diseases followed by infections. Only 60% of all patients with chronic renal insufficiency respond to the active immunization against Hepatitis B, patients with healthy kidneys respond in about 90% of the cases. Within an active immunization the vaccination response depends on the function of dendritic cells such as T- and B-lymphocytes. Therefore the vaccination response is a parameter for integral measurement of the immune system's function. Consequently, a distorted vaccination response is an expression of immune system's dysfunction.

### Study hypothesis

Within this study according to the generated data an association between the decreased formation of the antibodies due to the active Hepatitis B preventive vaccination, and an increased mortality of dialysis patients should be established.

### Materials and methods

The hypothesis was established on the basis of the retrospective analysis of vaccination titers and mortality of 876 patients. The data were collected to the chronic dialysis program in nephrological centres in Feldkirch and Graz between 01/01/2001 and 12/31/2008.

### Results

Due to the missing data sets of several patients, only 426 patients were considered in this study. HBs antibodies titer was determined within 1 year after the immunization of these patients. The allocation of patients to the different centers was not considered in order to develop the survival curves. The mortality of seroprotection vs. no-seroprotection as well as seroconversion (vaccination titer

is >10 IU/ml) vs. no-seroconversion was evaluated separately. A significant association between seroprotection and mortality rate was observed ( $p=0.041$ ). In case of seroconversion similar behaviour was determined ( $p=0.068$ ).

### Discussion

As it is a retrospective analysis, some limiting factors should be taken into account within the evaluation process of the results from this study. The main parameters are on the one hand the vaccination schedules, which were standard between 2001- 2008, but are now outdated. On the other hand the differing vaccination schedules used at the two nephrological centers. In spite of the fact that the vaccination titer is a variable value, which could lead to the incorrect statistical data, the hypothesis of this study could be confirmed due to the statistical evaluation.

## Einleitung

„Der Anfang ist die Hälfte des Ganzen“

*Aristoteles*

Mit genau dieser Weisheit von Aristoteles stürzte ich mich vor gut 2 Jahren in diese Diplomarbeit hinein, welche dazu diente, unsere damals aufgestellte Hypothese mit Hilfe einer retrospektiven Studie zu untersuchen. Die Hypothese besagte, dass eine verminderte Antikörperbildung im Rahmen der aktiven Hepatitis B Schutzimpfung mit einer erhöhten Mortalität bei Dialysepatient/innen assoziiert ist. Der Hintergrund des Ganzen war, dass alle Patienten mit chronischer Nierenerkrankung nach internationalen Richtlinien aktiv gegen Hepatitis B immunisiert werden. Dabei soll zur sicheren Wirksamkeit ein Impftiter von >100 IU/ml erreicht werden. Insgesamt sprechen aber nur ca. 60% aller dieser Patienten auf die Hepatitis B Impfung, bei der Nierengesunden ist dieses Ansprechen deutlich höher. Die Impfantwort im Rahmen einer aktiven Immunisierung hängt von der Funktion der dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten ab und stellt damit einen Parameter zur integralen Messung der Funktion des Immunsystems dar. Eine gestörte Impfantwort ist somit Ausdruck einer Dysfunktion des Immunsystems und wahrscheinlich auch Mitursache der hohen Mortalität, woraus sich eben unsere bereits am Anfang erwähnte Hypothese ableitete.

Um den Einstieg in die Thematik zu erleichtern, werden zunächst alle nötigen Grundlagen, die zum besseren Verständnis beitragen sollen, vermittelt. Dazu wird die Fragestellung dieser Arbeit in Einzelteile zerlegt und systematisch im ersten Abschnitt besprochen. Eingegangen wird auf einige Aspekte der Hepatitis B Erkrankung, verknüpft mit interessanten Fakten und Feststellungen diesbezüglich. Ebenfalls wird die Frage beantwortet, wie sich die Immunität bei Dialysepatienten im Vergleich zu den Nierengesunden unterscheidet, dazu werden die damit verbundenen Ursachen und Mechanismen präsentiert und erläutert. Anschließend wird die Hepatitis B Impfung besprochen, mit allen dazu nötigen und wichtigen Aspekten, welche für die Fragestellung der Diplomarbeit relevant sind. Im

Abschnitt zwei werden die Methodik und der Studienaufbau erklärt, sowie die Studienhypothese dargelegt. Komplettiert wird diese Diplomarbeit mit den Ergebnissen und Diskussion der gewonnenen Ergebnisse, sowie einem kleinen Ausblick in diesem Themengebiet.

Ich wünsche den Lesern viel Spaß und frohes Schaffen.

Im November 2013

## I Grundlagen

### 1 Mortalität bei Dialysepatienten

Aktuell bekommen weltweit über 1,5 Millionen Patienten eine Nierenersatztherapie, der größte Teil davon – Hämodialyse.(1) Es wird angenommen, dass die Anzahl der Dialysepatienten weltweit jährlich um 7% ansteigt.(2) Schon in relativ frühen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz ist die Funktion des Immunsystems beeinträchtigt. Beim dialysepflichtigen Patienten beobachtet man das Vollbild des sekundären Immundefekts, welcher hier erheblich zur Morbidität und Mortalität beiträgt.(3)

Dialysepatienten haben ein extrem hohes Mortalitätsrisiko von 10-15 % pro Jahr. Laut Analysen des US Renal Data System lag der Anteil der Infektionen an den Todesursachen im Jahr 2000 bei nahezu 16 % und stellte so die zweithäufigste Ursache nach kardiovaskulären Ereignissen dar.(4)

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind aber die führende Ursache für die Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Das Mortalitätsrisiko hierbei ist, wenn man solche Parameter wie Alter, Geschlecht, und Vorhandensein von Diabetes bei Dialysepatienten außeracht lässt, 10-20-mal höher als in der Allgemeinbevölkerung. (5) Außer traditionellen Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie, Rauchen, Diabetes Mellitus etc., spielen bei der Entstehung der kardiovaskulären Erkrankungen bei Dialysepatienten mitunter auch andere Faktoren eine wichtige Rolle. Diese sind vor allem Störungen im Elektrolythaushalt sowie Osteoporose, welche im terminalen Stadium der Niereninsuffizienz bei fast allen Patienten vorkommen. KDIGO (6) charakterisiert diese Störungen nicht nur als Dysfunktion des Kalzium-, Phosphat-, Vitamin-D und Parathormonhaushaltes sondern auch als Arteriosklerose der Koronar- und anderer Arterien, welche zur erhöhten kardiovaskulären und Gesamtmortalität führen (7).

Zahlreiche Untersuchungen zeigen eine Assoziation der Mortalitätsrate mit Zeichen einer Inflammation oder Malnutrition wie erhöhtem CRP oder niedrigem Serumalbumin.(8) Ebenfalls als nachgewiesen gilt eine inverse Assoziation zwischen Serum-Natrium-Konzentration und Mortalitätsrisiko.(9)

## 2 Hepatitis B

### 2.1 Epidemiologie

Von allen uns heutzutage bekannten Hepatitis-Viren stellen Hepatitis B (HBV), Hepatitis D (HDV) und Hepatitis C (HCV) die größte Gefahr für Dialysepatienten. Diese Viren werden parenteral übertragen und haben die Fähigkeit im Organismus zu persistieren, was des Öfteren zur Chronifizierung führen kann, letzteres hat zur Folge, dass sich nicht selten eine Leberzirrhose und in weiterem Verlauf ein Hepatozelluläres Karzinom entwickeln kann. (10; 11)

HBV ist von herausragender medizinischer Bedeutung. Weltweit sind rund 300 Millionen Menschen chronisch mit HBV infiziert. (12) Alleine in Deutschland gehen 50-60% aller gemeldeten Hepatitisfälle auf das HBV zurück. In unseren Breiten liegt die Prävalenz der HBs-Ag-positiven Personen bei 0,3-0,7% in der Bevölkerung. Im höheren Lebensalter weisen bis zu 30% der Bevölkerung Antikörper gegen HBV auf. (13)

Die Inzidenz der Hepatitis B bei Dialysepatienten hat aufgrund rigoroser Hygienevorschriften, Impfungen, räumlicher Trennung und getrennter Maschinen erfreulicherweise deutlich abgenommen.(14) Ende 70er Jahre lag diese z.B. in Frankreich bei 28%, in Deutschland bei 12%(15), zu Beginn der 90er Jahre sank sie in Frankreich auf 6,1% und in Deutschland auf 3%(16). Sicherlich positive Auswirkung hat auch das verbesserte Screening von Blutkonserven, die seit Einführung von Erythropoietin auch wesentlich seltener verabreicht werden müssen.(14) Dies darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass die Infektion in anderen Ländern weiterhin sehr häufig vorkommt (Abbildung 1) und aufgrund der zunehmenden Reisetätigkeit von Dialysepatienten zu uns eingeschleppt werden kann. (3)

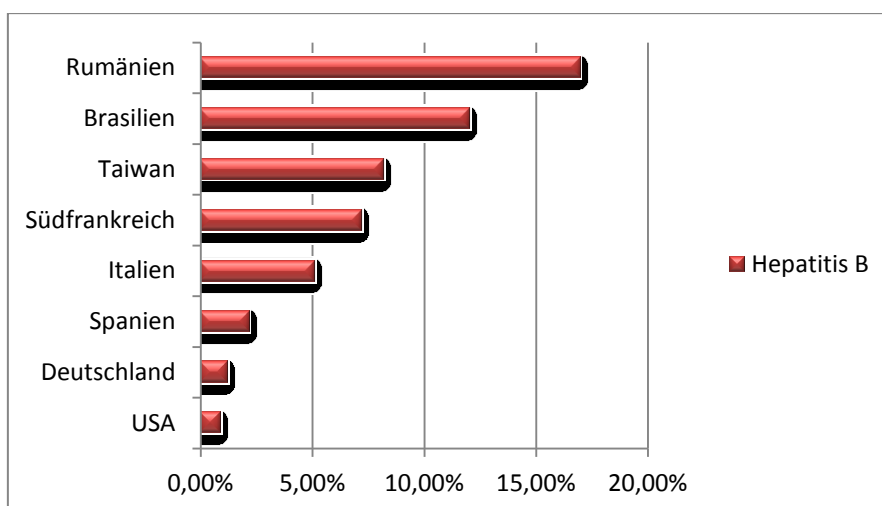


Abbildung 1: Prävalenz von Hepatitis B unter Dialysepatienten(3)

## 2.2 Klinischer Verlauf bei Dialysepatienten im Vergleich zu Nierengesunden.

Die Unterschiede zwischen Dialysepatienten und Nierengesunden sind hinsichtlich des klinischen Verlaufs von Infektionen bei Hepatitis B noch deutlicher als bei anderen Hepatitiden.(17) Dies ist wahrscheinlich der Tatsache geschuldet, dass die Dialysepatienten aufgrund ihrer Grundkrankheit als immunsupprimiert gelten.(18)

Ende der 60er Jahre wurde man durch mehrere Endemien der Hepatitis B in Dialysezentren auf die besondere Verlaufsform der Erkrankung bei diesen Patienten im Vergleich zum ebenfalls betroffenen nierengesunden Patienten aufmerksam. Der Nierengesunde erleidet in der Regel je nach Literatur nach einer Inkubationszeit zwischen 3 Wochen und 7 Monaten eine akut symptomatische Hepatitis, die nach unspezifischen Prodromi wie subfebrilen Temperaturen, Krankheitsgefühl und Abdomenschmerzen zum Ikterus mit Hepatosplenomegalie führt.(19) Serologisch lässt sich eine Konversion von der zuverlässig in Frühstadium detektierbaren Virämie zur antikörperbedingten Elimination des Virus nachweisen.(3) Typischerweise werden Transaminasenanstiege auf das 100fache der Norm, eine Hyperbilirubonämie sowie erhöhte Cholestasewerte beobachtet.(19) Die Prognose ist günstig. In der Regel heilt die Erkrankung aus und es kommt in etwa 5-10% zur Chronifizierung, die nach Jahren zur Leberzirrhose und zum hepatozellulären Karzinom führen kann. Lebensbedrohliche fulminante Verläufe sind relativ selten (0,1-0,5%), allerdings

sind diese in 80% tödlich.(17; 19; 12) Detaillierten klinischen Verlauf der HBV-Infektion zeigt Abbildung 2.

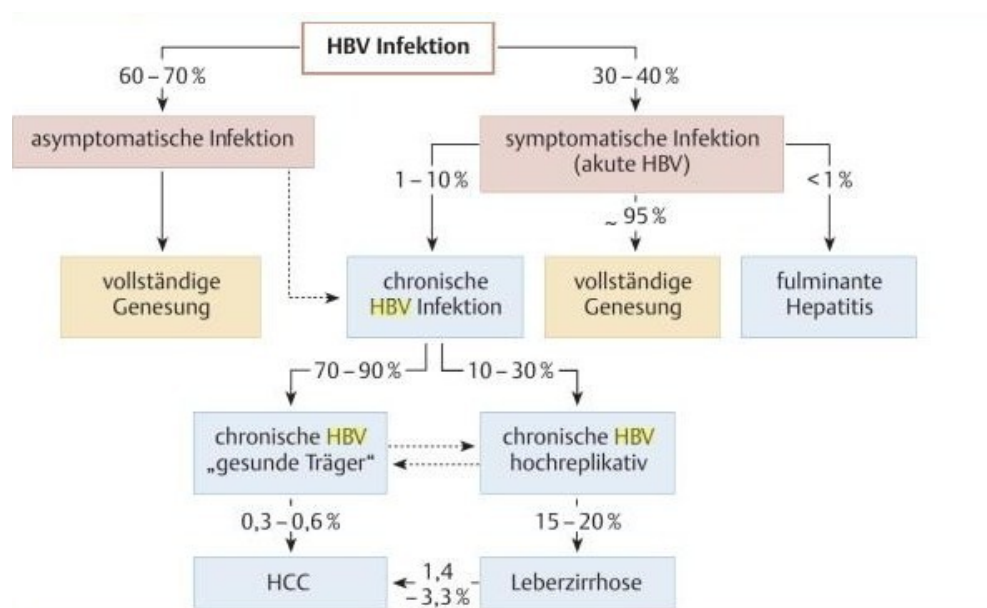


Abbildung 2: Klinische Verlaufsformen der HBV-Infektion(13)

Deutlich anders stellt sich die Situation beim dialysepflichtigen Patienten dar. Oftmals wird hier die Diagnose erst verzögert und aufgrund der serologischen Testung gestellt, da asymptomatische und anikterische Verläufe überwiegen. Die Transaminasen bleiben überwiegend niedrig, manchmal sogar im Normbereich.(19) Es ist somit wenig überraschend, dass alleine aufgrund klinischer Beobachtungen bei Dialysepatienten die Diagnose einer akuten Hepatitis häufig verfehlt wird. Wegen ihrer Immunitätslage sind viele Dialysepatienten mit akuter Hepatitis B nicht in der Lage, das HBV aus dem Serum zu eliminieren.(18) So heilt die Erkrankung in der Folge in 50-60% (14) der Fälle nicht aus und es bleibt bei chronischer Virämie. Meist kommt es nicht zur Bildung von Antikörpern, die Immunität gegen das Virus vermitteln. Die chronische Verlaufsform der Hepatitis B beim Nierengesunden hat eine ungünstige Prognose und führt häufig zu schweren Lebererkrankungen mit Zirrhose und hepatozellulärem Karzinom. Aufgrund des Immundefektes des Nierenkranken kommen diese Konsequenzen bei dauerhaft infizierten Dialysepatienten selten vor. In vielen Fällen beobachtet man den nahezu lebergesunden Träger des

Hepatitis B-Virus, eine Krankheitskonstellation, die bei normaler Nierenfunktion kaum jemals vorkommt.(3)

Der natürliche Verlauf einer HBV-Infektion bei Dialysepatienten ist schwierig zu evaluieren, ganz besonders, weil normalerweise im Endstadium einer Niereninsuffizienz die GPT-Aktivität erniedrigt ist und der natürliche Verlauf einer chronischen HBV-Infektion bei dieser Patientengruppe einen langen Zeitrahmen beansprucht. Im Vergleich zur Allgemeinpopulation haben die Dialysepatienten deutlich erhöhtes Mortalitätsrisiko und weisen zwar ein erhöhtes Risiko der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) auf, verglichen mit der allgemeinen Bevölkerung jedoch, sind die Überlebensraten von HBs-positiven im Vergleich zu HBs-negativen Patienten bei Langzeithämodialyse, zumindest in den USA, nicht unterschiedlich. (18)

Im Falle einer Chronifizierung der HBV-Infektion bei dialysepflichtigen Patienten beobachtet man den schwersten Verlauf nach der Nierentransplantation. Dies hängt hauptsächlich damit zusammen, dass die Patienten immunsupprimiert werden müssen, was einerseits dazu beiträgt, dass es zu keiner Abstoßungsreaktion der Nieren kommt und andererseits aber führt es zur verstärkten Virusreplikation, was zusätzlich die Progredienz von Leberzirrhose und HCC fördert.(20; 21)

### **2.3 Übertragung**

Es ist länger bekannt, dass die Übertragung von HBV überwiegend parenteral erfolgt. Entsprechend gefährdet sind: medizinisches Personal, Dialysepatienten, Patienten, die Blutkonserven oder Plasmaprodukte erhalten und i.v. Drogenabhängige. Daneben kann es zu Infektionen durch sexuellen Kontakt kommen, sowie im Rahmen von Akupunktur und Tätowierungen.(13) Dies gilt mehr oder weniger für die Allgemeinbevölkerung.

Bei Dialysepatienten sieht sie Sache etwas anders aus. Aktuell scheinen die Übertragungswege von HBV in Dialysezentren verstanden zu sein. Man geht davon aus, dass die Ansteckung durch die kontaminierten Dialysegeräte und Arbeitsmaterialien zustande kommt. Bedenken sollte man, dass im Gegensatz zu HIV und HCV, bei denen die Viruslast in etwa bei  $3 \times 10^3$ (22) bis  $10^4$ - $10^5$  Kopien/ml (23) liegt, die für die HBV-Infektion charakteristische Virämie bedeutend größere

Dimensionen erreicht und etwa bei  $5 \times 10^6$  bis  $3 \times 10^9$  Kopien/ml liegt.(24) Die Übertragung vom Virus durch das Dialysat wird als relativ unwahrscheinlich angesehen, da HBV praktisch nicht in der Lage ist die Dialysemembran zu überwinden, so dass sich in der Lösung eine unbedeutende Menge an Viruspartikel wiederfindet.(25)

## 2.4 Prävention

Prinzipiell besteht die Prävention der Hepatitis B bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz aus 2 Säulen:

Allgemeine Hygienemaßnahmen, die die Verbreitung des Virus im Rahmen der Dialysebehandlung verhindern sollen. Dazu zählen:

- a) Räumliche Trennung. Da Hepatitis-B-Virus hoch infektiös ist, reichen meist geringe Mengen von Blut infizierter Patienten. Daher sollte eine räumliche Trennung HBsAg-positiver Patienten von solchen, die nicht immun sind, vorgenommen werden. Separate Dialysegeräte und Arbeitsgerätschaften für die chronisch infizierten Patienten sollten ebenfalls vorzusehen werden.
- b) Schutzhandschuhe. Beim Arbeiten am und mit dem Patienten sollten grundsätzlich Schutzhandschuhen getragen werden. Damit eine Verschleppung von Verunreinigungen von einem Patienten zum nächsten verhindert werden kann, sollten die Handschuhe patientenbezogen benutzt werden.
- c) Zuordnung von Dialysegeräten. Es wird die exklusive Zuordnung von Dialysegeräten zu HBsAg-positiven Patienten aufgrund der möglichen Kontamination der äußeren Oberflächen mit Blutspritzern empfohlen, dabei spielt eine Virusübertragung durch Kontamination der inneren Schlauchsysteme und Pumpen eines Dialysegeräts keine Rolle.
- d) Desinfektion. Für die Desinfektion von HBsAg-kontaminierten Gegenständen sind speziell ausgewählte, wirksame Desinfektionsmaßnahmen nötig, da das Virus sowohl gegen Chemikalien als auch Austrocknung sehr resistent ist. Die kontaminierten Oberflächen können bis zu 7 Tage infektiös bleiben. Ebenfalls sollte man auf einen fachgerechten Einsatz von Desinfektionsmittel, die von der Deutschen

Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie für diesen Zweck empfohlen wurden, achten. (19)

Immunsierung. Es ist notwendig eine dauerhafte Aufrechterhaltung eines möglichst hohen Anteils immunisierter Patienten in Dialysezentren zu erzielen, damit die Ausbreitungsmöglichkeiten der Infektion minimiert werden können.(19)

### 3 Immunität

#### 3.1 Immunabwehr von HBV beim Gesunden

Die Immunabwehr gegen das Hepatitis-B-Virus wird hauptsächlich durch die T-Lymphozyten gewährleistet. Im aktivierten Zustand sind die zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten in der Lage, die mit HBV-infizierten Zellen zu zerstören. Die Aktivierung der CD4+ T-Helferzellen, die für das HBV spezialisiert sind, führt zur Proliferation der B-Lymphozyten, die ihrerseits protektive Antigene produzieren, die die Verbreitung des Virus im Organismus limitieren. Der auslösende Faktor in dieser Kaskade ist HBsAg. Der Prozess der Ausbildung von Antikörpern ist besonders beim Erstkontakt mit HBV von Bedeutung. Eine große Rolle spielt dieser ebenfalls dann, wenn sich das Virus unter Einfluss von zytotoxischen T-Lymphozyten aus den lysierten Zellen der Leber befreit. Die antigen-spezifische Aktivierung der Lymphozyten geschieht nach dem Treffen, Verarbeitung und Präsentation des Antigens durch die antigenpräsentierenden Zellen (APZ).(26)

Der detaillierte Ablauf dieser Kaskade ist folgendermaßen zu beschreiben (Abbildung 3): das virale Antigen wird durch die APZ aufgenommen und über das HLA-Klasse-II-Molekül und den T-Zell-Rezeptor (TZR) der T-Zelle präsentiert. Entscheidend für die T-Zell-Aktivierung ist das sekundäre Signal, welches über B7 an das T-Zell-Molekül CD28 vermittelt wird. Unter dem Einfluss des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin 2 (IL-2) kommt es zur klonalen Expansion sowie Differenzierung der für das Virusantigen spezifischen Zellen. Je nach Zytokinmuster der Differenzierung wird die zelluläre Effektorfunktion (Eliminierung infizierter Hepatozyten) bzw. die humorale Immunantwort (Bildung von anti-HBs durch B-Zellen) induziert.(19)

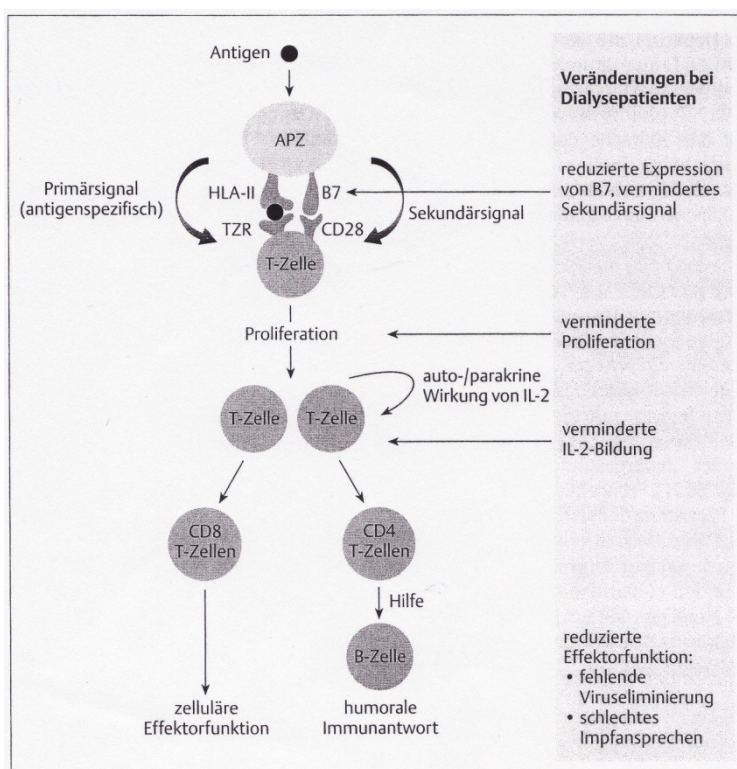


Abbildung 3: Immunabwehr von HBV beim Gesunden und beim Patienten mit Niereninsuffizienz.(19)

### 3.2 Immunabwehr von HBV bei Niereninsuffizienz

Es ist schon längere Zeit bekannt, dass ein Immundefizit mit der chronischen Niereninsuffizienz einhergeht. Doherty et al (1998) (27) bezeichneten diesen Zustand als urämischen Immundefekt. Ursprünglich ging man davon aus, dass die Immundefunktionsstörungen bei Niereninsuffizienz, deren Ursache die Dysfunktion der T-Lymphozyten zugrunde liegt(28), hauptsächlich mit verminderter Proliferation der T-Zellen und mit verminderter Bildung von IL-2 (Abb. 2) und anderen Zytokinen einhergeht(29). Und obwohl der relative Prozentanteil an wichtigen Immunglobulinen (IgG, IgA, IgM) beim Endstadium der chronischen Niereninsuffizienz annähernd konstant bleibt, so wird die spezifische antikörperbezogene Immunantwort unterdrückt(30; 31).

Die Studien der letzten Jahre bestätigten die Annahme, wonach man sowohl von einer wesentlichen Schädigung der zellulären Immunität bei Urämie, als auch der Störung der T-Zell-Aktivierung ausging. Die Untersuchungen von Girndt et al (1994)(32) haben gezeigt, dass die wahrscheinlichste Ursache dieser Dysfunktion die reduzierte Expression vom B7-Molekül an der Oberfläche von Monozyten um

etwa 30-40% im Vergleich zu Gesunden darstellt. Durch die reduzierte co-stimulatorische Signalgebung kommt es zu verminderter Produktion des Wachstumsfaktors IL-2, der die T-Zell-Bildung fördert. Dennoch ist die verminderte Produktion von IL-2 nicht, wie man früher dachte, die Ursache sondern die Folge des Immundefizites, welches für das terminale Stadium der Niereninsuffizienz typisch ist.

Somit kommt es bei der Urämie infolge der Dysfunktion der APZ zu verminderter Aktivierung der CD4+ T-Helfer-Zellen. Dies bestätigen die Untersuchungen in vitro, deren Ergebnisse belegen, dass bei der Erhaltung der co-stimulatorischen Signalgebung die Funktion der T-Zellen nicht gestört wird(28).

Die Funktionsstörung der CD4+ T-Helfer-Zellen bei HBV-infizierten Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hat sowohl Auswirkungen auf die Funktion der zytotoxischen T-Zellen, als auch auf die Aktivität der B-Lymphozyten.(31)

### **3.3 Auslösende Faktoren für Immundefunktionsstörung bei Dialysepatienten**

Auf der Suche nach Ursachen für die Immundefunktionsstörung bei Dialysepatienten und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz lassen sich viele auslösender Faktoren aufdecken. Zunächst ist festzuhalten, dass die Funktion des Immunsystems durch chronische Niereninsuffizienz in mehrerer Hinsicht beeinträchtigt wird.

Physiologischerweise übernehmen die Nieren eine umfangreiche Clearancefunktion für immunologisch aktive Proteine wie Zytokine, lösliche Rezeptorproteine und andere Mediatoren. Diese werden glomerulär filtriert und tubulär metabolisiert, im Harn sind sie in der Regel nicht nachweisbar. Für viele immunologische Mediatoren stellen die Nieren den Hauptabbauort dar.(33; 3) Diese Funktion geht mit abnehmender glomerulärer Filtrationsrate verloren. Sehr viele dieser Proteine weisen daher bei Niereninsuffizienz erhöhte Plasmaspiegel auf, ohne dass ihre Produktion gesteigert wäre. Sie haben teilweise hemmende, teilweise aktivierende Wirkungen auf verschiedene Komponenten des Immunsystems. Die so entstandene urämische Intoxikation führt zusätzlich zu Störungen des Immunsystems. (3)

Während die genannten Einflüsse graduell bereits bei kompensierter Retention aufzufinden sind, kommt beim Dialysepatienten der Einfluss des Nierenersatzverfahrens auf die Immunfunktion hinzu. Zwar wird die Intoxikation durch die Dialyse teilweise gebessert, das Immunsystem allerdings steht nun unter dem zusätzlichen Einfluss der aktivierten Wirkung des extrakorporalen Verfahrens. (3)

Desweiteren sah man in den letzten Jahren zunehmend deutlich, dass sowohl die ausgeprägte Bildung von Sauerstoffradikalen („oxidativer Stress“) als auch die Entstehung von pathologischen Glucose- und Eiweißmetaboliten für die Immunfunktionsstörung bedeutsam sind. (34) (Abbildung 4)

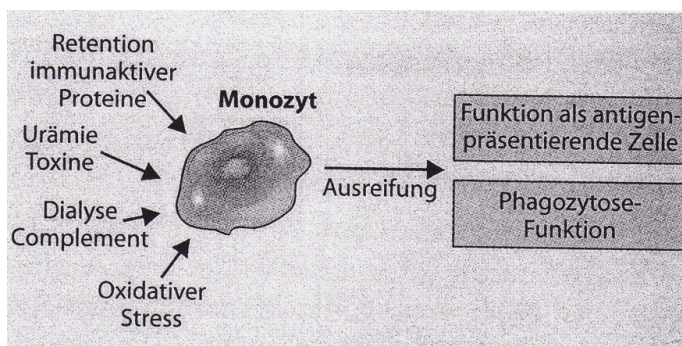


Abbildung 4: Einflussfaktoren auf die Ausreifung und Funktion immunkompetenter Zellen bei chronischer Niereninsuffizienz(3)

Man darf bei der Aufzählung der Einflussfaktoren auf das Immunsystem nicht übersehen, dass ein großer Teil der Dialysepatienten an Diabetes mellitus leidet, wodurch ebenfalls ein sekundärer Immundefekt ausgelöst wird. (3)

### 3.4 Ursachen für verminderte Impfantwort bei Dialysepatienten

Für besseres Verständnis sei nochmals erwähnt, dass es prinzipiell zwei Möglichkeiten gibt, wie eine Immunantwort zustande kommt. Sie verläuft entweder T-Zell-abhängig oder aber T-Zell-unabhängig. Entscheidend für den Ablauf einer Impfantwort sind der entsprechende Impfstoff und seine Bestandteile. So z.B. lösen Polysaccharid-haltige Impfstoffe (z.B. Pneumokokkenantigene) eine T-Zell-unabhängige Reaktion aus, während diejenigen, die mitunter Peptide und Proteine enthalten (z.B. HBV-Impfung), eine T-Zell-abhängige Reaktion auslösen.(35)

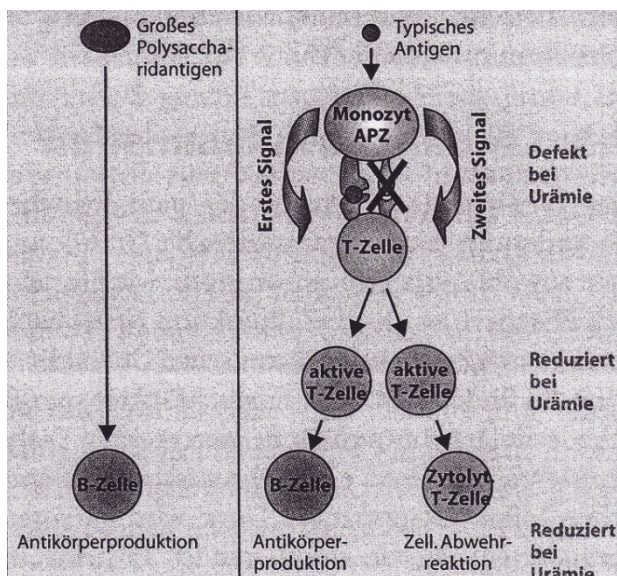


Abbildung 5: Störung der zellulären Immunität bei chronischer Niereninsuffizienz(3)

Wie bereits in den vorigen Kapiteln erwähnt, hat man bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz durch die Urämie eine gestörte zelluläre Immunität, wo die APZ einen Defekt auf der Ebene des zweiten, für die T-Zelle essentiellen, Aktivierungssignals aufweisen(3). Genauerer Ablauf zeigt die Abbildung 5. So lässt sich auch erklären, warum eine HBV-Impfung eine verminderte Impfantwort auslöst, während z.B. die Impfantwort gegen Pneumokokkenantigene weitgehend normal bleibt.(31)

Dennoch kann man damit alleine nicht erklären, warum es zu unterschiedlichen Impfantworten unter dem Kollektiv der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz kommt, zumal fast alle Dialysepatienten die genannten Immundefekte aufweisen. Diese Problematik wurde gründlich unter die Lupe genommen von Girndt und Kohler (2002)(17). Die Autoren vermuten, dass die Variabilität der Impfantworten damit zu erklären ist, dass es zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen kommt, die von den mononukleären Zellen des peripheren Blutes produziert werden, was zur zusätzlichen Immunitätsstörung führt(36).

Vor nicht allzu langer Zeit wurde bekannt, dass es genetisch determinierte individuelle Besonderheiten des Organismus gibt, die in der Lage sind den proinflammatorischen Faktoren entgegenzuwirken. Man fand heraus, dass Interleukin-10 (IL-10) dafür verantwortlich ist, diese Faktoren sowohl bei den Gesunden als auch bei den Dialysepatienten zu unterdrücken(36). Die Produktion des IL-10 seinerseits wird über ein spezielles Gen gesteuert. Die Polymorphie

dieses Gens entscheidet dann darüber, wie der Träger auf die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine reagieren wird. Die Dialysepatienten, welche ein Genotyp besitzen, das für die verstärkte Produktion von IL-10 sorgt haben weniger ausgeprägte Merkmale chronischer Entzündung im Gegensatz zu Trägern des Genotyps, welches für geschwächte Produktion von IL-10 sorgt. Die aktive Bildung von IL-10 hängt direkt mit der Effektivität der Immunisierung gegen Hepatitis B.(37)

Girndt und Kohler (2002)(17) vermuten, dass die herabgesetzte urämische Intoxikation und erniedrigte proinflammatorische Aktivität einen positiven Einfluss auf die Impfantwort bei Dialysepatienten haben müssten. Sie sind der Meinung, dass diese Hypothese klinisch noch nicht bestätigt werden konnte, auch wenn man in der Tat das Niveau der proinflammatorischen Aktivität mit Hilfe von z.B. speziellen Dialysegeräten und sterilem Dialysat senken könnte(38). Das Herabsetzen der urämischen Intoxikation führt zwar zur besseren Funktion des Immunsystems, es bleibt allerdings unklar, ob dies dann auch tatsächlich zur besseren Impfantwort bei Patienten mit terminalem Stadium der chronischen Niereninsuffizienz führt. Man konnte beobachten, wie die Aktivität der Lymphozyten bei Urämie nach der Hämodialyse ansteigt.(39)

## **4 Hepatitis B Impfung**

### **4.1 Vakzine**

Hepatitis B ist eines der bedeutendsten Infektionskrankheiten der Welt. Man geht davon aus, dass rund 200-500 Mio. Menschen infiziert sind. Dabei sind besonders gefährdet nicht nur das medizinische Personal sondern ebenfalls die Dialysepatienten. Letztere können sich sowohl durch die Blutprodukte, die ihnen verabreicht werden, als auch infolge von Kontamination äußerer Oberflächen und Dialysegerätschaften infizieren (40). Nachdem man im Jahre 1982 den Hepatitis-B-Impfstoff zur Verfügung stellte und empfohlen hatte diese sowohl beim Personal als auch bei Dialysepatienten zu verwenden, wurden bis 1999 insgesamt etwa 55% der Patienten und 88% der Mitarbeiter geimpft (41). In der Zeit von 1976 bis 1997 sank die Inzidenz der Hepatitis B Neuerkrankungen bei Dialysepatienten in

den USA von 3% auf 0,05%. Somit ist es sehr wichtig in dieser Patientengruppe die Vakzine zu verwenden (40).

Die ursprünglich aus Humanplasma gereinigten Impfstoffe ersetzte man bereits in den 80er Jahren durch rekombinant produziertes HBsAg, sodass keine Bedenken hinsichtlich der Virussicherheit mehr bestanden. Seither wird die Immunogenität der Vakzine durchs Hinzufügen von z.B. viralen Antigenen präS1 und präS2 ständig verbessert (19).

Die heute zur Verfügung stehenden Impfstoffe in den USA sind Engerix-B® sowie Recombivax HB®. Während Engerix-B® 20 µg/ml enthält, sind es beim Recombivax HB 10-40 µg HBsAg Protein pro ml (41).

#### **4.2 Hepatitis B Impfung bei Dialysepatienten in Vergleich zu Gesunden**

Es ist seit längerem bekannt, dass es deutliche Unterschiede der Impfantwort zwischen den Gesunden und den Dialysepatienten gibt (40). Eine Standardimpfung mit 3 i.m. Injektionen (0, 1, 6 Monate) erzeugt bei ca. 95% der Gesunden eine protektive Antwort. Die restlichen 5% weisen eine verminderte Immunantwort gegen HBV auf. Man vermutet, dass dies mit bestimmten HLA-Allelen assoziiert ist, welche scheinbar die Antigene des Virus nicht ausreichend präsentieren können. Der Antikörpertiter fällt bei den Gesunden recht langsam und vorhersehbar ab, sodass man den neuerlichen Zeitpunkt der Impfung relativ leicht abschätzen kann (19).

Deutlich problematischer sieht es bei Dialysepatienten aus. Man fand heraus, dass beim Hochrisikokollektiv der Hämodialysepatienten die Serokonversionsrate und die Höhe der Antikörpertiter deutlich reduzierter sind. Der Antikörpertierspiegel fällt ebenfalls deutlich schneller ab als bei der nierengesunden Population. Starken Einfluss darauf haben Alter, Geschlecht, Übergewicht und Rauchen (40). Zahlreiche Autoren belegen die Tatsache des geringeren Ansprechens auf die Impfung bei Dialysepflichtigen Patienten. Mitwalli (1996) (42), Peces et al. (1997) (43), Khan et al. (1996) (44), Kaperionis et al. (1999) (45) beobachteten eine Impfantwort mit einem Titer von über 10 IU/ml bei 66,7%; 72,5%; 74%; 79% und maximal Bergia et al. (1992) (46) – bei 81,4% der geimpften Dialysepatienten. Selbst die Verdoppelung der Impfdosis auf 40 µg bei vierfacher Injektion mit dem Schema 0-1-2-6 brachten nicht den gewünschten

Effekt (47) und man so weiterhin gezwungen ist neuere Ansatzpunkte bei der Hepatitis B Impfprophylaxe zu suchen.

### 4.3 Impfstatus

Die Effektivität der Hepatitis B Impfung beurteilt man anhand des Antikörpertiters (HBsAg). Ein allgemein anerkanntes Kriterium für erfolgreiche Impfantwort wird ein Antikörpertiter von über 10 IU/ml angesehen (48). Dennoch erlebte man bereits Fälle, wo sogar bei nierengesunden Menschen der Titer relativ schnell abfiel und im Blut gar nicht mehr nachweisbar war, sofern man nach der Impfung keine Titer von über 100 IU/ml erreichte. Daher wird aufgrund zahlreicher Forschungsergebnisse und Publikationen empfohlen einen Antikörpertiter von über 100IU/ml anzustreben.

Sherlock und Dooley (1997) (49) definierten drei verschiedene Formen einer Impfantwort gegen Hepatitis B:

- Antikörpertiter < 10 IU/ml: Non-responder, keine Impfantwort, kein Impfschutz
- Antikörpertiter >10 - <100IU/ml: Low-responder, schwache Impfantwort
- Antikörpertiter >100 IU/ml: Ausreichende Impfantwort

Bei ausreichender Impfantwort werden jährliche Kontrollen empfohlen. Sofern der Titer unter 10 IU/ml fällt, sollte aufgefrischt werden. Bei Low-respondern werden halbjährliche Kontrollen bevorzugt. Beim Anfall von unter 10 IU/ml ebenfalls Auffrischung. Bei Non-respondern sollte man eine Intrakutanimpfung in Erwägung ziehen, jährlich HBsAg kontrollieren und zusätzlich bei Expositionsrisiko die Patienten von den HBV-positiven Patienten trennen (19). (Abbildung 6)

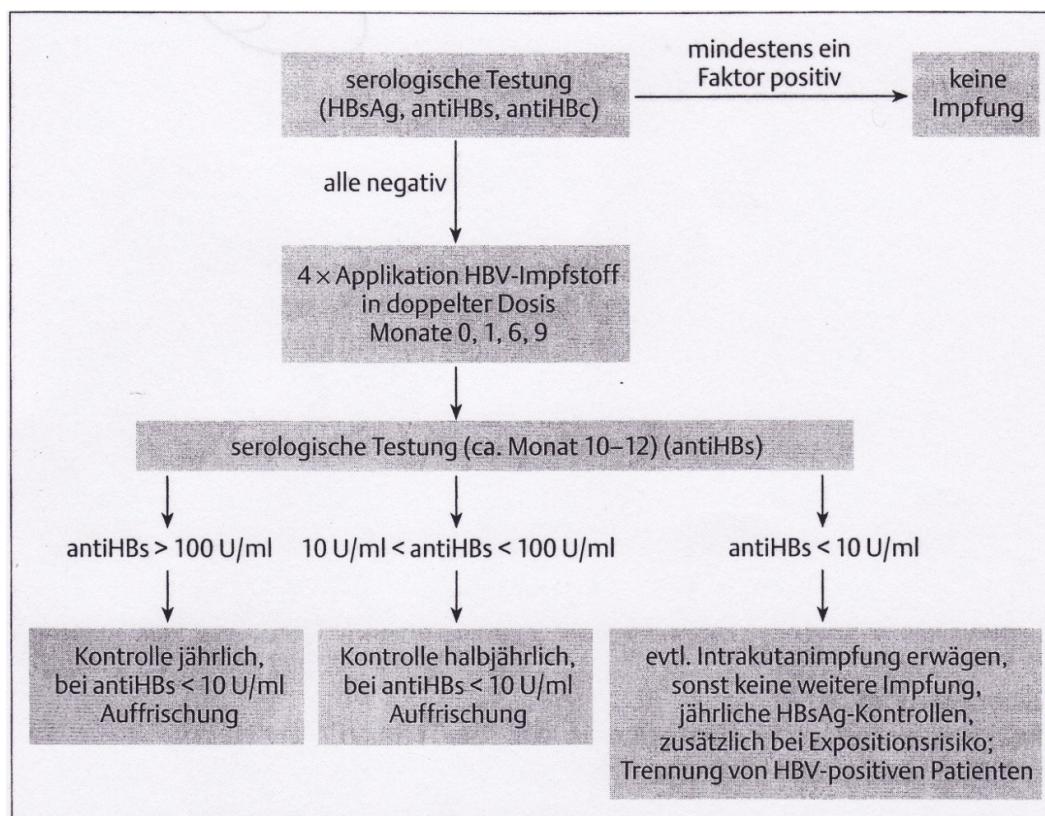


Abbildung 6: Hepatitis-B-impfung bei Dialysepatienten (19)

#### 4.4 Impfschema

Die Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung verschiedener Studien, welche die Effektivität und die Sicherheit hoher Impfdosen (40 µg) bei vierfacher Gabe untersucht haben. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz lag die Serokonversionsrate bei 66-90,5%. (50; 51; 52; 53; 54)

All diese Studien versuchten die Impfantwort mittels höherer Impfdosen, im Vergleich zu Standardimpfung von 10-20 µg (Bezug auf das Jahr 2007), zu erzielen. An der Studie von Mc Multy et al. nahmen 106 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz teil. Dabei untersuchte man die Unterschiede in der Serokonversion bei einer Impfdosis von 20 µg bzw. 40 µg bei dreifacher Impfung (0-1-6 Monat). Höher war dabei die Serokonversionsrate bei Patienten, die jeweils eine Impfdosis von 40 µg erhielten. (55)

Charest et al. verglich in seiner Studie die beiden Impfmöglichkeiten miteinander. Dabei erfolgte die intrakutane Injektion alle 2 Wochen mit einer Dosis von 5 µg, während die intramuskuläre mit einem Impfschema 0-1-2-6 und einer Dosis von 40 µg erfolgte. Bei den Patienten mit i.m. Injektion konnte eine Serokonversionsrate von

97,6% und bei Patienten mit i.c. Injektion – 90,5% erreicht werden. Die Autoren empfehlen eine i.c. Gabe von 4 µg alle 2 Wochen, bis ein Antikörpertiter von über 1000 IU/ml erreicht ist, oder eine Gesamtimpfdauer von 18 Monaten. (54)

Jadoul et al. untersuchten das Verhalten der Serokonversionsrate bei einer wiederholten Gabe von Standarddosis von 20 µg monatlich, bis eine Antikörpertiter von 100 IU/ml erreicht wurde bzw. 10 Gaben erfolgten. Nach 5 Monaten lag die Serokonversionsrate bei 42% bzw. bei 70% nach 12 Monaten. (56)

Den Patienten mit einem Antikörpertiter von <10 IU/ml können zusätzliche Impfdosen gegeben werden. Alternativ ist ebenfalls die intrakutane Injektionsgabe denkbar. (40)

Autoren	Patienten	Dosis, Vakzine, Schema	Impfplan (Monate)	Ergebnisse, Serokonversionsrate*
Kara et al. (50)	15 HD	40 µg, Engerix B® oder HB Vax IIB i.m.	0, 1, 2, 6	12 (80%)
Liu et al. (51)	47 HD 22 PD	40 µg, Engerix B® i.m. 40 µg, Engerix B® i.m.	0, 1, 2, 6 0, 1, 2, 6	37 (78,7%) 17 (77,3%)
Bel`eed et al. (52)	136 HD 55 PD 19 NINS	40 µg, Engerix B® i.m. 40 µg, Engerix B® i.m. 40 µg, Engerix B® i.m.	0, 1, 2, 3 0, 1, 2, 3 0, 1, 2, 3	90 (66%) 36 (66%) 13 (68%)
Charest et al. (54)	41 HD 42 HD	5 µg rekomb. HB Vakzine i.c. 40 µg, Engerix B® i.m.	alle 2 Wochen 0, 1, 2, 6	40 (97,6%) 38 (90,5%)
Da Roza et al. (53)	165 NINS	40 µg, Engerix B® i.m.	0, 1, 6	136 (82%)
Mc Nulty et al.(55)	51 NINS 55 NINS	20 µg, Engerix B® i.m. 40 µg, Engerix B® i.m.	0, 1, 6 0, 1, 6	29 (57%) 37 (67%)
Jadoul et al.(56)	23 HD	20 µg, Engerix B® i.m.	jeden Monat	16 (70%) nach 12 Mo.
Tong et al. (57)	82 83	20 µg, Engerix B® i.m. 20 µg, Fendrix B® i.m.	0, 1, 2, 6 0, 1, 2, 6	84% 91%
HD: Hämodialyse, PD: Peritonealdialyse, NINS: chronische Niereninsuffizienz i.m.: intramuskulär, i.c.: intrakutan *Antikörpertiter >10 IU/ml				

Tabelle 1: Zusammenfassung verschiedener Forschungsergebnisse über Hepatitis B Impfung bei Patienten mit chron. Niereninsuffizienz (40)

Die Studie von Tong et al. befasste sich mit der neuen Vakzine gegen Hepatitis B - Fendrix®, welche Monophosphoryl-Lipid A (MPL-A), ein gereinigtes Derivat von Lipopolysacchariden aus Bakterienzellwänden, in Kombination mit einem Aluminiumsalz (Komplex AS04) enthält. An der Studie nahmen sowohl prä- als auch dialysierte Patienten teil. Als Ergebnis kam raus, dass die

Serokonversionsrate mit Fendrix® 20 µg (0-1-2-6 Monate) höher war, als die mit Engerix® 20 µg beim gleichen Impfschema. (57)

Somit sind folgende Impfschemata allgemein zu empfehlen (40):

- Engerix B® 40 µg mit einem Impfschema 0-1-2-6 Monate
- Fendrix® 20 µg mit einem Impfschema 0-1-2-6 Monate
- Recombivax HB® 20 µg mit einem Impfschema 0-1-6 Monate

#### **4.5 Neuere Ansatzpunkte und Strategien bei der Hepatitis B Prophylaxe**

Seit einigen Jahren gibt es verschiedene Ansatzpunkte und Strategien zur Verbesserung und Optimierung der Impfantwort auf Hepatitis B. Die vier wichtigsten davon kommen in diesem Kapitel zur Sprache:

1. Änderung der Injektionsart (i.m. vs i.c.)
2. Anpassung des Impfzeitpunktes ( Beginn vor der Nierenersatztherapie)
3. Erprobung zahlreicher Adjuvanzien und Zytokine
4. Einsatz von Impfstoffen neuer Generationen mit Hinzufügen der viralen Antigene präS1 und präS2.

Der erste Weg nahm seinen Ursprung nachdem eine Gruppe von Forschern aus den USA (58) gezeigt hat, dass man bei gesunden Probanden mit 2 µg Vakzine intrakutan (0-1-6 Monate) nahezu identische Ergebnisse erzielen kann, wie beim verabreichen von Standarddosen intramuskulär nach dem gleichen Schema.

1991 berichteten Ono und Kashiwagi (59) über erfolgreiches Einsetzen intrakutaner Vakzine mit einer Dosis von 5 µg alle 2 Wochen bei Dialysepatienten. Die Autoren richteten den Augenmerk darauf, dass die Ergebnisse sowohl was die Höhe des Antikörpertiters als auch was die Anzahl der Patienten angeht, bei denen ein protektiver Antikörpertiter erreicht werden konnte, nahezu identisch waren und die intrakutane Injektion kein Nachsehen gegenüber intramuskulärer hatte. Gleichzeitig erfolgte bei der intrakutanen Injektion eine wesentlich schnellere Bildung des Antikörpertiters. Eine Serokonversion (> 10 IU/ml) konnte bei intrakutaner Injektion bereits eine Woche nach Beginn der Vakzination beobachtet werden, während solche bei intramuskulärer erst nach 8 Wochen zustande kam. Solch eine schnelle Bildung eines Impfschutzes ist besonders

wichtig und aktuell bei den Dialysepatienten, wo das Risiko einer frühen Infektion besonders hoch ist.

Marangi et al. (1994) (60) erforschten das Verhalten der Impfantwort auf die intrakutane Injektionsgabe je 5 µg alle 2 Wochen bei einer kleinen Gruppe von Patienten, bei welchen die intramuskuläre Vakzine (Impfschema: 0-1-2-6-12-18 Monate) versagt hatte. Bereits 2 Monaten nach der Umstellung auf intrakutane Gabe konnte ein protektiver Antikörpertiter erreicht werden. Gleichzeitig beobachtete man allerdings eine deutlich schnellere Abnahme der Antikörperkonzentration dieser Patienten im Vergleich zu denen, die bei einem Standardimpfschema protektiven Antikörpertiter bildeten. Die positiven Ergebnisse auf die intrakutane Injektionsgabe begründeten die Autoren durch vermutlich längeren Verbleib der Antigene in der Haut und den Besonderheiten in der Präsentation der Antigene durch die APZ (Langerhans-Zellen), welche dem Einfluss der Urämie bei Dialysepatienten weniger ausgesetzt sind also die APZ der regionalen Lymphknoten. Die angeführten Ergebnisse konnten durch Vlassopoulos et al. (1997) (61) bestätigt werden.

2007 kamen Morais et al. (62) zum Entschluss, dass die intrakutane Injektionsgabe eine gute Alternative bei der Hepatitis B Impfprophylaxe bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz darstellt. An dieser Studie nahmen 70 Patienten teil. Es konnte eine Serokonversionsrate (>10 IU/ml) von 82% erreicht werden. 12 Monate später konnte man diese immernoch bei 58,7 % der Patienten beobachten.

Ein anderer Weg der der Optimierung der Impfantwort auf Hepatitis B bei Dialysepatienten besteht im maximal frühen Beginn der Impfprophylaxe, da die Depression der humoralen Immunität sich bereits im frühen Stadium der Niereninsuffizienz zeigt (63). Kohler (1994) (16) ist der Meinung, dass die Impfprophylaxe optimalerweise auf den Zeitpunkt der geringen Azotämie fallen sollte. Jungers et al. (1990) (64) schlagen vor mit der Immunisation zu beginnen, solange die renale Clearance nicht unter 20 ml/min gesunken ist.

Ein Problem wird im langen Zeitraum bis zum Eintritt in die Dialysepflicht gesehen, so dass bis zum Dialysebeginn die Impfmunität bereits wieder verloren geht und eine Nachimpfung erfolgen müsste. Somit dürfte die Impfung am optimalsten sein, wenn es in ca. 3-6 Monaten mit dem Eintritt in die Dialysepflicht zu rechnen ist, spätestens jedoch bei der Einlage eines Dialyse-Shunts. (19)

Eine weitere Möglichkeit in der Steigerung der Effektivität der Impfantwort sah man im Einsetzen verschiedener Adjuvanzien. Dazu zählen solche wie Thymopentin, Zink, GM-CSF oder Interleukin-2. Allerdings konnte keiner dieser Adjuvanzien so richtig überzeugen. (19) Erst beim 2005 neu zugelassenen Fendrix® mit dem Adjuvanssystem (AS04) konnten signifikant höhere Seroprotektionsraten und Antikörperkonzentrationen als beim älteren Impfstoff Engerix-B® erzielt werden (65).

Letzter Ansatzpunkt im Bezug auf das Hinzufügen der viralen Antigene präS1 und präS2 ist bereits etabliert worden. Die Antigene werden erfolgreich zur Verbesserung der Immunogenität der Impfstoffe eingesetzt. (19)

## II Material und Methoden

Bei der von uns durchgeführten Studie handelt es sich um eine retrospektive Analyse, welche im Zeitraum vom Januar 2012 bis Oktober 2012 stattfand. In dieser Zeit wurden die Daten von 876 Patient/innen gesammelt und entsprechend dokumentiert. Dazu bedienten wir uns der Patientenlisten, die uns freundlicherweise von den unten genannten Zentren und dem ÖDTR zur Verfügung gestellt wurden. Diese Listen umfassten alle inzidenten Patient/innen von 2001 bis 2008 inklusive Geburtsdatum, Geschlecht, renaler Grunderkrankung, Comorbiditäten bei Erstdialyse, Datum der 1. Dialyse, Dialysemodalität zum Zeitpunkt der ersten Dialyse, Zentrumcode bei Erstdialyse, Zentrumcode 90 Tage nach Therapiebeginn, letzter Zentrumcode, Datum letzte Therapie, - letzte bekannte Therapiemodalität bei Ende Beobachtungszeitraum, Todesdatum und Todesursache, Transplantationsdatum (der ersten Nierentransplantation). Die Daten wurden in einer von uns vorab festgelegten Tabelle erfasst und vor Ort bei den entsprechenden Zentren, wo die Patient/innen in Behandlung waren/sind, erhoben. Die anschließende statistische Auswertung der Daten erfolgte im Zeitraum zwischen Oktober 2012 und September 2013 in anonymisierter Form.

### **Studienhypothese**

Anhand der gewonnenen Daten wollten wir untersuchen, ob eine verminderte Antikörperbildung im Rahmen der aktiven Hepatitis B Schutzimpfung mit einer erhöhten Mortalität bei Dialysepatient/innen assoziiert ist.

### **Ethikkommission**

Für die Durchführung der Studie waren die Patientenaufklärung und Versicherungsschutz nicht notwendig. Vorab wurde die Studie durch die Leitethikkommission der Medizinischen Universität Graz begutachtet und bewilligt. Detaillierte Informationen über das Studiendesign siehe unten.

### **Studiendesign**

#### *Beteiligte Zentren:*

- Akademisches Lehrkrankenhaus Feldkirch (Abteilung für Nephrologie und Dialyse)
- Medizinische Universität Graz (Klinische Abteilung für Nephrologie)

#### *Einschlusskriterien:*

- Alle Patient/innen > 18 Jahre, die ins chronische Dialyseprogramm eingeschlossen und aktiv gegen Hepatitis B immunisiert wurden.
- Beginn der Dialyse 01.01.2001 bis 31.12.2008
- Mindestüberleben an der Dialyse 3 Monate

*Ausschlusskriterien:*

- Patientenalter bei Beginn der Nierenersatztherapie  $\leq$  18 Jahre
- Dauer der Nierenersatztherapie  $\leq$  90 Tage
- Transfer ins Ausland innert 90 Tage
- Wiedererlangen der Nierenfunktion innert 90 Tage
- Exitus letalis innert 90 Tage
- Immunsuppressive Therapie
- Bekannte maligne Erkrankungen bei Dialysebeginn
- HIV-Infektion
- Hepatitis B Infektion
- Schwangerschaft

**Erhobene Daten**

*Demographie (Daten zum Zeitpunkt des Dialysebeginns):*

- Alter
- Geschlecht
- Diabetes ja/nein
- Nierengrunderkrankung
- Kardiovaskuläre Erkrankungen (KHK, pAVK, cAVK) (in Diagnoselisten bzw. aus ÖDTR)
- Herzinsuffizienz (in Diagnoseliste)
- Zeitpunkt (Datum) Dialysebeginn
- Dialysemodalität (HD/PD)
- BMI
- Zeitpunkt Impfung (kategoriiell: Prädialyse oder Dialyse; Datum 1. Und 3. Impfung; falls Boosts einfach ablesbar Datum letzter Boost – Feldkirch)
- Impfschema (evtl. einteilen in die verschiedenen Schemata)
- Kumulative Impfdosis
- Studienzentrum

*Labor bei Dialysebeginn:*

- Höchster Anti-HBs Antikörper Titer (wenn bei Dialysebeginn noch nicht geimpft, dann höchster Titer innerhalb ersten Jahres)
- CRP
- Albumin
- 25OH Vitamin D3
- Hb (Zeitpunkt der Abnahme erwähnen, je nach Zentrum)
- Phosphat
- Kalzium
- iPTH

*Mortalitätsdaten:*

- Todesdatum
- Zeit seit Dialysebeginn (lässt sich aus Dialysebeginndatum und Sterbedatum einfach errechnen)
- Todesursache

*Statistik:*

- Ende der Beobachtungszeit 31.12.2011
- Beobachtungsende: Tod, NTX, Lost of Follow-Up, End of Follow-Up (31.12.2010)
- Deskriptive Statistik (Mittelwert  $\pm$  SD, Median (25., 75. Perzentile), Häufigkeiten)
- ANOVA für Gruppenvergleiche
- Kaplan-Meier-Überlebenskurve für Patient/innen mit Titer > 100 IU/ml vs <100 IU/ml, bzw. >/< 10 IU/ml, bzw. dann >/< Titermedian
- Multivariates Cox-Regressionsmodell

### III Ergebnisse

Aufgrund fehlender Datensätze bei manchen Patient/innen sind letztendlich nur 426 Patient/innen in die Studienwertung eingegangen. Dabei handelte es sich um solche, bei denen der HBsAK-Titer maximal innerhalb 1 Jahres nach Immunisierung bestimmt wurde.

#### 1 Baseline-Charakteristika der Patienten

Hier zunächst die allgemeinen Charakteristika der Patienten aufgeschlüsselt nach Zentren. Bei insgesamt 426 Patienten, kamen 211 aus Feldkirch und 215 aus Graz. Dabei war die Geschlechtsverteilung in beiden Zentren relativ identisch. Etwa 37-39% waren dabei Frauen und ca. 60-62% Männer (Tabelle 2). Tabelle 3 beschreibt welche Dialyseart die Patienten bei NET Beginn bekamen. Dabei sieht man, dass in beiden Zentren eher die Hämodialyse (mit 82,9% bzw. 93,5%) bevorzugt wurde.

Center		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	Gültig				
	Female	79	37,4	37,4	37,4
	Male	132	62,6	62,6	100,0
	Gesamt	211	100,0	100,0	
<b>Graz</b>	Gültig				
	Female	84	39,1	39,1	39,1
	Male	131	60,9	60,9	100,0
	Gesamt	215	100,0	100,0	

Tabelle 2: Geschlechtsaufteilung nach Zentren

Center		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	Gültig				
	HD	175	82,9	82,9	82,9
	PD	36	17,1	17,1	100,0
	Gesamt	211	100,0	100,0	
<b>Graz</b>	Gültig				
	HD	201	93,5	93,5	93,5
	PD	14	6,5	6,5	100,0
	Gesamt	215	100,0	100,0	

Tabelle 3: Erste NET

Nach 3 Monaten änderte sich das Bild kaum und die Patienten wurden weiterhin mit der Dialyseart therapiert, mit welcher man auch begann (Tabelle 4).

Center		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	Gültig	HD	177	83,9	83,9
		PD	34	16,1	100,0
		Gesamt	211	100,0	100,0
<b>Graz</b>	Gültig	HD	197	91,6	91,6
		PD	18	8,4	100,0
		Gesamt	215	100,0	100,0

Tabelle 4: NET nach 3 Monaten

Während des Beobachtungszeitraumes sind in Feldkirch insgesamt 86 von 211 Patienten (40,8%) verstorben. 82 davon starben noch während der NET und 4 nachdem sie transplantiert wurden. In Graz gab es insgesamt 142 Todesfälle (66%). Dabei starben 139 während der NET und 3 nach der Transplantation (Tabelle 5, Tabelle 6).

Center		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	Gültig	alive	61	28,9	28,9
		dead	82	38,9	67,8
		transplanted	68	32,2	100,0
		Gesamt	211	100,0	100,0
<b>Graz</b>	Gültig	alive	48	22,3	22,3
		dead	139	64,7	87,0
		transplanted	28	13,0	100,0
		Gesamt	215	100,0	100,0

Tabelle 5: Überlebensstatus

Center		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	dead	86	40,8	40,8	40,8
	Gültig alive	125	59,2	59,2	100,0
	Gesamt	211	100,0	100,0	
<b>Graz</b>	dead	142	66,0	66,0	66,0
	Gültig alive	73	34,0	34,0	100,0
	Gesamt	215	100,0	100,0	

Tabelle 6: dead or alive

Schaut man nun auf die Todesfälle, die kardiovaskulär oder infektiös bedingt waren, so kommt man auf insgesamt 57 Patienten in Feldkirch und 84 in Graz. Dies entspricht einer Sterberate von 27% bzw. 39,1%. (Tabelle 7). Andere Todesursachen werden im Rahmen dieser Studie nicht explizit aufgeschlüsselt. Von den 57 verstorbenen Patienten in Feldkirch wiesen 46 eine kardiovaskuläre und 11 eine infektiös bedingte Ursache auf. In Graz waren bei 84 Todesfällen 59 kardiovaskulär und 25 infektiös bedingt (Tabelle 8, Tabelle 9).

Center		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	no	151	71,6	72,6	72,6
	Gültig yes	57	27,0	27,4	100,0
	Gesamt	208	98,6	100,0	
	Fehlend System	3	1,4		
	Gesamt	211	100,0		
<b>Graz</b>	no	105	48,8	55,6	55,6
	Gültig yes	84	39,1	44,4	100,0
	Gesamt	189	87,9	100,0	
	Fehlend System	26	12,1		
	Gesamt	215	100,0		

Tabelle 7: Mortalität kardiovaskulär oder infektiös bedingt

Center		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	no	162	76,8	77,9	77,9
	Gültig yes	46	21,8	22,1	100,0
	Gesamt	208	98,6	100,0	
	Fehlend System	3	1,4		
	Gesamt	211	100,0		
<b>Graz</b>	no	130	60,5	68,8	68,8
	Gültig yes	59	27,4	31,2	100,0
	Gesamt	189	87,9	100,0	
	Fehlend System	26	12,1		
	Gesamt	215	100,0		

Tabelle 8: Kardiovaskuläre Mortalität

Center		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	no	197	93,4	94,7	94,7
	Gültig yes	11	5,2	5,3	100,0
	Gesamt	208	98,6	100,0	
	Fehlend System	3	1,4		
	Gesamt	211	100,0		
<b>Graz</b>	no	164	76,3	86,8	86,8
	Gültig yes	25	11,6	13,2	100,0
	Gesamt	189	87,9	100,0	
	Fehlend System	26	12,1		
	Gesamt	215	100,0		

Tabelle 9: Mortalität nach Infektion

Insgesamt hatten 35,1% der Patienten in Feldkirch Diabetes, in Graz waren es sogar 43,3% (Tabelle 10).

In Feldkirch begann man meistens bereits vor der Dialyse zu impfen. So waren es dort 63% der Patienten bereits vorgeimpft, in Graz hingegen waren es lediglich 19,5%. (Tabelle 11)

Center			Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	Gültig	no	137	64,9	64,9	64,9
		yes	74	35,1	35,1	100,0
		Gesamt	211	100,0	100,0	
<b>Graz</b>	Gültig	no	121	56,3	56,5	56,5
		yes	93	43,3	43,5	100,0
	Gesamt	214	99,5	100,0		
	Fehlend	System	1	,5		
	Gesamt		215	100,0		

Tabelle 10: Diabetes

Center			Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
<b>Feldkirch</b>	Gültig	pre-RRT	133	63,0	63,0	63,0
		during RRT	78	37,0	37,0	100,0
		Gesamt	211	100,0	100,0	
<b>Graz</b>	Gültig	pre-RRT	42	19,5	19,5	19,5
		during RRT	173	80,5	80,5	100,0
	Gesamt	215	100,0	100,0		

Tabelle 11: Impfzeitpunkt

Tabelle 12 zeigt einige Prädiktoren der Studie, welche die Unterschiede zwischen den Zentren zeigen. Die Feldkirchner Patienten sind etwas jünger, leben länger, haben weniger Entzündung (niedrigeres CRP), höheres Albumin und Hämoglobin, niedrigere Calciumspiegel und höhere Titer (Anti-HBs).

Center		Age	Survival time (d)	Anti-HBs [IU/L]	CRP [mg/dL]	Albumin [g/dL]	Hämo globin [g/L]	Calcium [mmol/L]		
<b>Feldkirch</b>	N	Gültig	211	211	211	115	133	171	103	
		Fehlend	0	0	0	96	78	40	108	
		Mittelwert	62,3	1398,5	479,3	1,3	3,7	113,3	2,14	
		Median	64,4	1380,0	,0	,7	3,7	115,0	2,18	
		Standardabweichung	14,5	808,2	2245,5	1,6	,7	16,6	,26	
		Perzentile	25	54,5	774,0	,0	,3	3,3	101,0	2,00
			75	73,3	1898,0	111,0	1,5	4,2	125,0	2,30
		N	Gültig	215	215	215	202	189	205	202
			Fehlend	0	0	0	13	26	10	13
			Mittelwert	64,5	1212,8	235,9	4,6	3,5	102,6	2,16
<b>Graz</b>		Median	67,2	1001,0	15,0	1,8	3,5	103,0	2,21	
		Standardabweichung	13,8	796,6	733,9	6,6	,6	19,6	,29	
		Perzentile	25	55,7	587,0	1,0	,7	3,1	93,5	2,00
			75	75,1	1744,0	162,0	5,7	3,9	115,0	2,36

Tabelle 12: Einige Prädiktoren der Studie im Vergleich

Prüft man nun einige Prädiktoren auf Signifikanz (Tabelle 13), so stellt man fest, dass die Patienten in Feldkirch signifikant länger leben ( $p=0,017$ ), haben niedrigere CV-Mortalität, niedrigere Infektionsmortalität, wurden häufiger transplantiert und sind trendmäßig seltener Diabetiker ( $p=0,091$ ). Beim Alter sieht man hingegen keine Signifikanz ( $p=0,104$ ).

	Signifikanz
Survival time (d)	,017
First RRT	,001
RRT after 3 Months	,018
CV-Mortality	,041
Infection Mortality	,008
Survival status	,000
Diabetes	<b>,091</b>
Age	<b>,104</b>
CV or infect Mortality	,001
Dead or Alive	,000

Tabelle 13: Signifikanz der ausgewählten Prädiktoren

## 2 Impfschema

Die statistische Auswertung der in der Studie beteiligten Patientendaten im Bezug auf das angewandte Impfschema hat doch ein ziemlich heterogenes Bild gezeigt. Die Tabelle 14 zeigt, welche Impfschemata bei den Patienten verwendet wurden. Interessant dabei sind allerdings eher nur 2 Gruppen, solche, die mit 3x20µg bzw. 4x20µg geimpft wurden, da dies die meistverwendeten Impfschemata mit 40,6% bzw. 36,2% sind. In diesen beiden Kollektiven hat man eine fast identische Serokonversionsrate von ca. 47% beobachtet. Es fällt allerdings etwas schwer diese Daten mit anderen Autoren zu vergleichen, da die Studie primär nicht darauf zielte.

Patienten	Prozent	Impfschema	Ergebnisse, Serokonversionsrate*
25	5,9	Other (1x20, 2x40; 2x20, 2x40; 1x20, 3x40; 3x20, 1x40)	9 (36%)
173	40,6	3x20 µg	82 (47,4%)
154	36,2	4x20 µg	71 (46,1%)
13	3,1	4x40 µg	7 (53,8%)
19	4,5	3x40 µg	9 (47,4%)
12	2,8	2x20 µg	5 (41,7%)
30	7	unbekannt	26 (86,7%)
Gesamt Patienten: 426			
*Antikörpertiter >10 IU/ml			

Tabelle 14: Impfschemata der Studie

## 3 Überlebenskurven

Nachdem wir die Unterschiede zwischen den beiden Zentren untersucht haben und die wichtigen Prädiktoren auf Signifikanz geprüft haben, stellten wir fest, dass einige davon doch eine Signifikanz aufweisen (Abschnitt II, Kapitel 1). Dies bedeutet in dem Fall, dass die Patienten aus Feldkirch allein durch die Behandlung dort per se schon einen unabhängigen signifikanten Überlebensvorteil aufweisen. Da wir nun also für die Erstellung der Überlebenskurven den

Zentrumseffekt rausgenommen haben, nahmen wir dementsprechend auch nur die Prädiktoren in die Gleichung für die Überlebenskurven rein, welche nicht signifikant waren. Diese sind dann: Alter, Diabetes, Impfzeitpunkt, Seroprotektion, Geschlecht und Dialyseart.

Die Abbildung 7 zeigt, wie sich die Überlebenskurve bei der Seroprotektion darstellt. Bei dieser Überlebenskurve haben wir alle Prädiktoren nochmals zentrenunabhängig auf Signifikanz untersucht und gesehen, dass das Alter (je älter desto höher Mortalitätsrisiko), Diabetes (Diabetes ja=höheres Mortalitätsrisiko) und die Seroprotektion (d.h. Titer > 100IU/ml =niedrigeres Mortalitätsrisiko) eine Signifikanz aufweisen, Impfzeitpunkt (Impfung vor Dialysebeginn=geringeres Mortalitätsrisiko) zeigte grade keine Signifikanz (p=0,051). Diese 4 Variablen wurden bei der Überlebenskurve berücksichtigt (Tabelle 15). Geschlecht und die Dialyseart zeigten keine Signifikanz und wurden bei in der Überlebenskurve 1 nicht berücksichtigt (Tabelle 16).

	B	SE	Wald	df	Signifikanz
Age	,052	,006	70,023	1	<b>,000</b>
Diabetes	,334	,134	6,230	1	<b>,013</b>
TimeImmunisation	-,319	,163	3,808	1	<b>,051</b>
Seroprotection	-,346	,169	4,191	1	<b>,041</b>

Tabelle 15: berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 1

	Score	df	Signifikanz
Gender	1,924	1	<b>,165</b>
Dialyseart	2,766	1	<b>,096</b>

Tabelle 16: nicht-berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 1

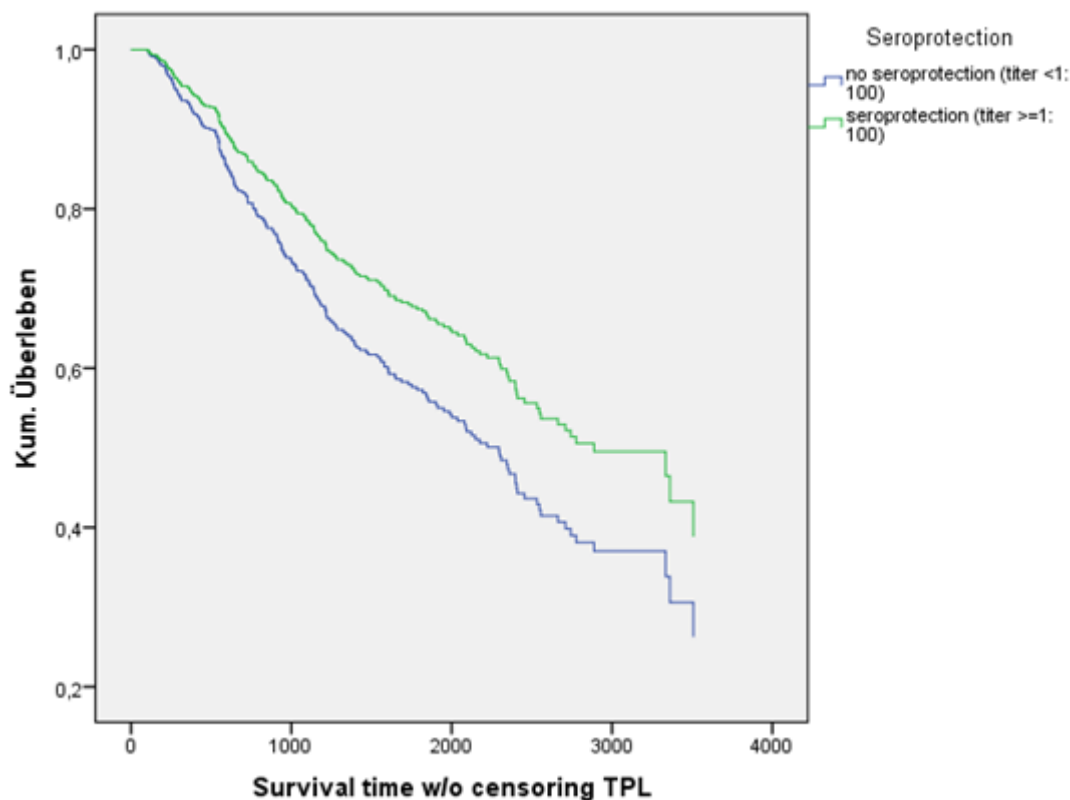


Abbildung 7: Überlebenskurve 1 ohne TPL-Zensur

Für die Serokonversion (d.h. Titer >10 IU/ml) verhält es sich ähnlich (Abbildung 8: Überlebenskurve 2 ohne TPL-Zensur, wenn auch nicht signifikant, aber der Trend ist da ( $p=0,068$ ) (Tabelle 17). Geschlecht und Dialyseart wurde hier ebenfalls nicht berücksichtigt (Tabelle 18).

	B	SE	Wald	df	Signifikanz
Age	,052	,006	70,190	1	<b>,000</b>
Diabetes	,354	,133	7,050	1	<b>,008</b>
Timelmmunisation	-,302	,167	3,281	1	<b>,070</b>
Seroconversion	-,261	,143	3,339	1	<b>,068</b>

Tabelle 17: berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 2

	Score	df	Signifikanz
Gender	1,673	1	<b>,196</b>
Dialyseart	2,689	1	<b>,101</b>

Tabelle 18: nicht-berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 2

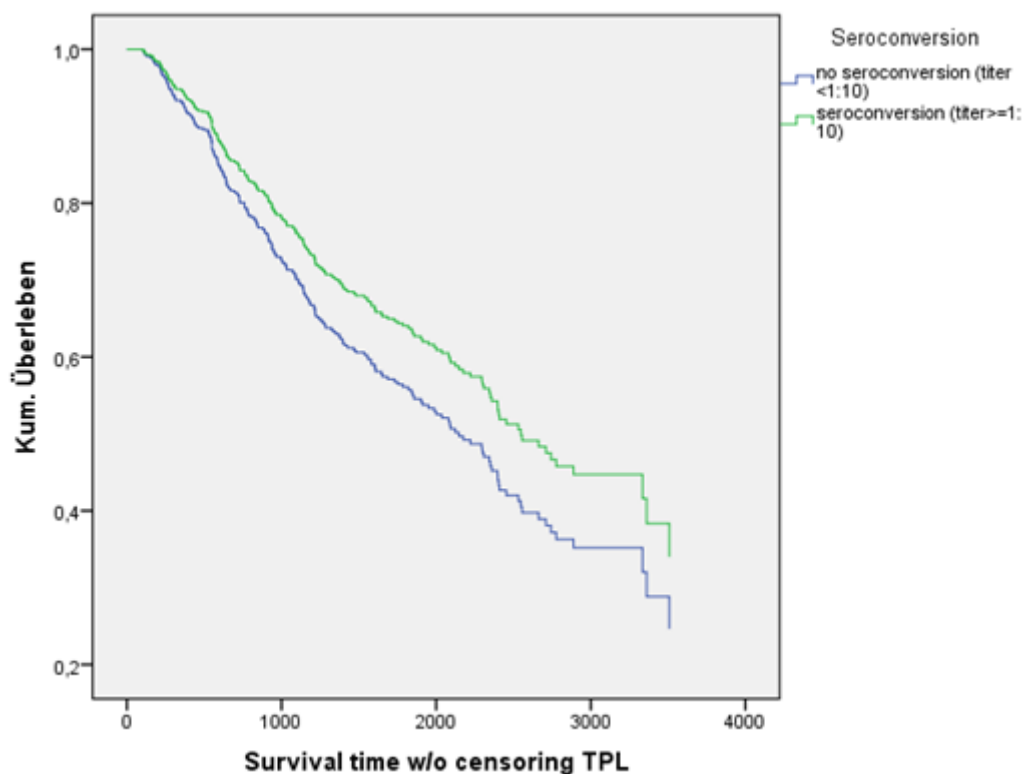


Abbildung 8: Überlebenskurve 2 ohne TPL-Zensur

Wird bei TPL zensiert (d.h. Transplantation=Studienende, n=330), bleiben nur mehr Alter, Seroprotektion und Serokonversion als signifikante Prädiktoren. Das heißt also, durch die Zensur bleibt der prädiktive Wert der Seroprotektion und der Seroconversion bestehen. Das Alter bleibt ebenfalls weiterhin ein signifikanter Prädiktor (Tabelle 19, Tabelle 21). Diabetes und Impfzeitpunkt fallen bei beiden raus (Tabelle 20, Tabelle 22).

	B	SE	Wald	df	Signifikanz
Age	,031	,007	20,833	1	,000
Seroprotection	-,337	,169	3,999	1	,046

Tabelle 19: berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 3

	Score	df	Signifikanz
Diabetes	1,521	1	,217
Gender	2,835	1	,092
Dialyseart	1,890	1	,169
TimeImmunisation	1,273	1	,259

Tabelle 20: nicht-berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 3

Berücksichtigt man nun die Variablen Alter und Seroprotektion, so bekommt man die Überlebenskurve 3 (Abbildung 9)

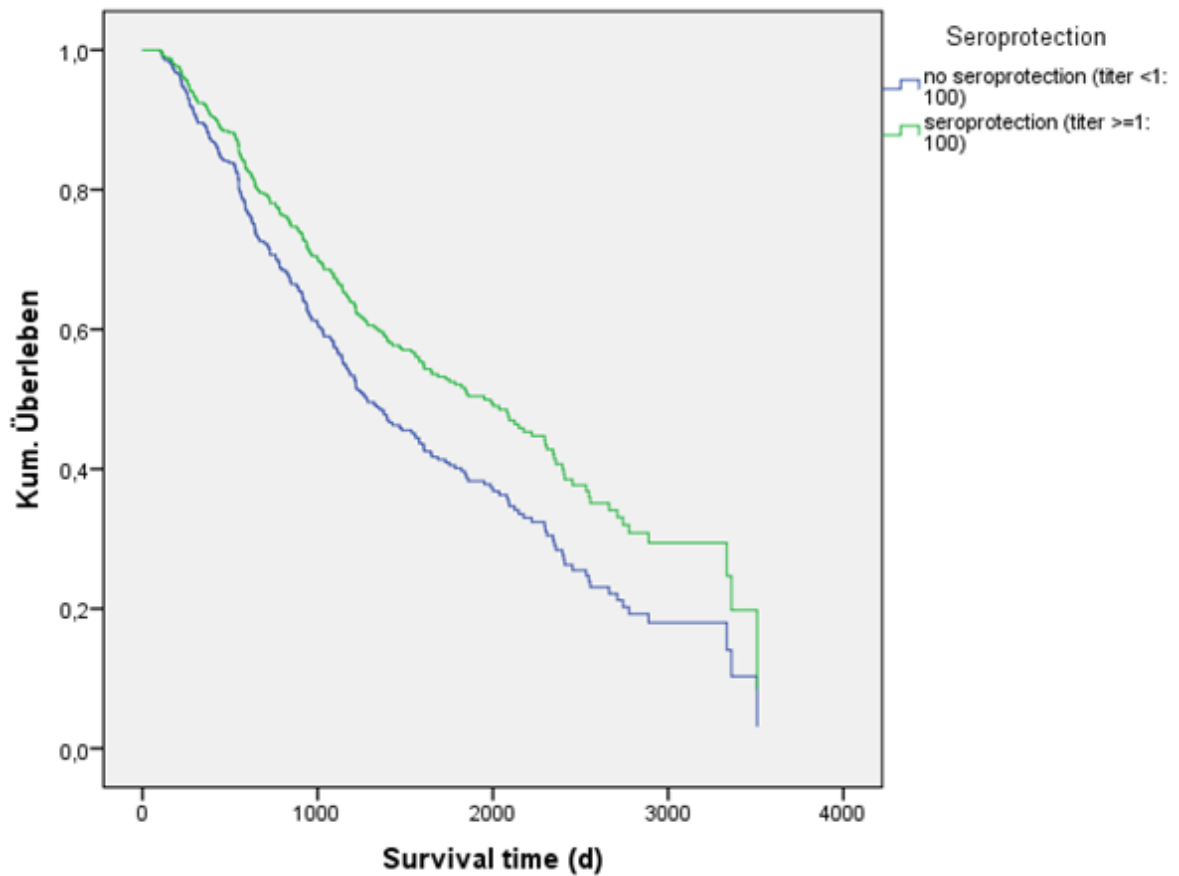


Abbildung 9: Überlebenskurve 3 mit TPL-Zensur

	B	SE	Wald	df	Signifikanz
Age	,031	,007	21,035	1	<b>,000</b>
Seroconversion	-,294	,139	4,461	1	<b>,035</b>

Tabelle 21: berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 4

	Score	df	Signifikanz
Diabetes	1,979	1	,160
Gender	2,437	1	,119
Dialyseart	1,778	1	,182
TimeImmunsation	1,025	1	,311

Tabelle 22: nicht-berücksichtigte Variablen für Überlebenskurve 4

Berücksichtigt man nun die Variablen Alter und Seroconversion (Tabelle 21), so bekommt man die Überlebenskurve 4 (Abbildung 10)

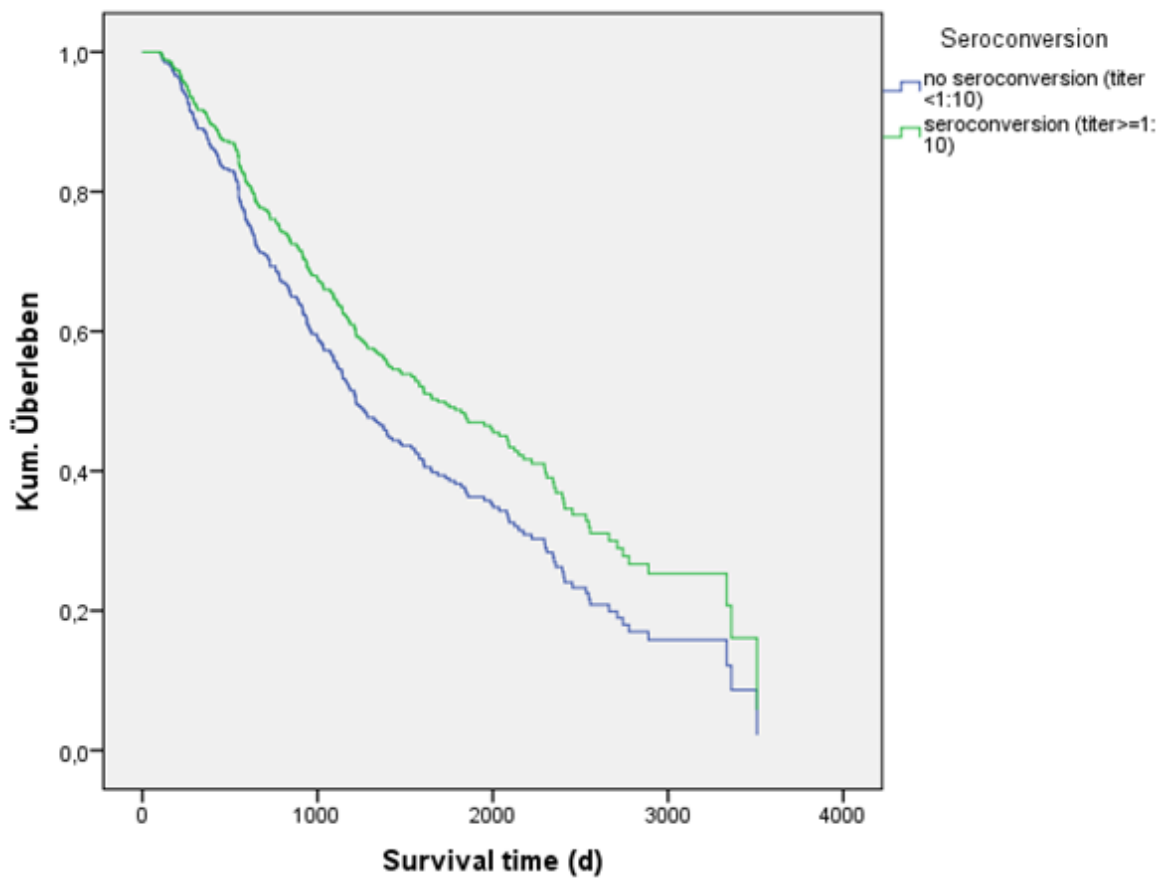


Abbildung 10: Überlebenskurve 4 mit TPL-Zensur

Man sieht also graphisch bei allen 4 Überlebenskurven deutlich, wie sich jeweils die grüne Kurve (jeweils Seroprotektion bzw. Seroconversion) von der violetten (no Seroprotektion bzw. no Seroconversion) absetzt, wodurch verdeutlicht wird wie eine bestimmte Überlebenszeit (Survival time) von größerer Menge an Patienten (kumulatives Überleben) erreicht wird, wenn man zum Kollektiv gehört, welcher mit der grünen Kurve abgebildet wird und das völlig unabhängig davon, ob man eine Seroprotektion oder nur Seroconversion aufweist.

## IV Diskussion

### 1 Hauptergebnisse

In dieser Diplomarbeit wurden retrospektiv Daten von 876 Patienten zusammengetragen und analysiert. Insgesamt konnten 426 Patienten in die Endauswertung aufgenommen werden, da bei den restlichen entweder einige Datensätze fehlten oder sie nicht die Kriterien des Studiendesigns erfüllten. Es galt mit Hilfe dieser Daten zu untersuchen, ob die von uns aufgestellte Hypothese, nach der eine verminderte Antikörperbildung (Impftiter) im Rahmen der aktiven Hepatitis B Schutzimpfung mit einer erhöhten Mortalität bei Dialysepatienten assoziiert ist, ihre Gültigkeit hat.

Da die Patienten aus 2 unterschiedlichen Zentren stammen, welche regional verschieden sind, wollten wir zunächst schauen welche Unterschiede die Zentren aufweisen. Dabei kam raus (Abschnitt III), dass die Patienten allein durch die Behandlung in Feldkirch bessere Überlebenschancen haben und auch andere Parameter, wie CRP, Albumin etc. waren dort besser. Man kann sich das vermutlich dadurch erklären, dass die Patienten in Feldkirch insgesamt gesünder waren, alleine wenn man sich schon die Anzahl der Diabetiker in Feldkirch im Vergleich zu Graz anschaut (Abschnitt III). Es ist ebenfalls so, dass die Patienten in Feldkirch in 63% der Fälle schon ambulant vor Dialysebeginn geimpft worden, während die Meisten (80,5%) in Graz ihre Impfung erst nach Dialysebeginn erhielten. Auch könnte man sich vorstellen, dass ein Zusammenhang darin besteht, dass in Graz es eine Universitätsklinik ist, wohin durchaus mehr schwerere Fälle eingeliefert werden im Vergleich zu einem normalen Krankenhaus in Feldkirch.

Zu den Tatsachen gehört dagegen der Fakt, dass wir anhand unserer statistischen Auswertung unsere Hypothese bestätigen konnten. Dazu haben wir zunächst alle Patienten zusammen untersucht und insbesondere auf die für uns entscheidenden Prädiktoren, wie Impftiter geschaut. Hierzu unterschied man zwischen solchen, die nur einen Titer von  $>10$  IU/ml (Seroconversion) zeigten und solchen, die einen Titer von  $>100$  IU/ml (Seroprotektion) hatten. Diese Gruppen verglichen wir jeweils mit denen, die keinen Titer hatten. Dabei konnten wir im Falle der Seroprotektion eine Signifikanz ( $p=0,041$ ) aufweisen. Bei der

Seroconversion fanden wir zwar keine Signifikanz, der Trend aber war da ( $p=0,068$ ). Um unsere Hypothese untermauern zu können, haben wir dann all die Patienten, die transplantiert wurden nochmals zensiert und erneut auf Signifikanz geprüft. Es kam wie erwartet heraus, dass sowohl die Patienten mit Seroprotektion ( $p=0,046$ ) also auch jene mit Serokonversion ( $p=0,035$ ) eine signifikant bessere Überlebenschance aufwiesen. Um die Ergebnisse visuell bzw. graphisch zu verdeutlichen, wurden Überlebenskurven erstellt, wo man sehr schön den Überlebensvorteil der Patienten mit einer positiven Impfantwort sehen kann. (Abschnitt III).

Da es uns nach längeren Recherchen nicht gelungen ist vergleichbare Studien zu finden, weil es solche offensichtlich nicht gibt, können keine Vergleiche der Ergebnisse mit anderen Studien aufgestellt werden.

Die Impfantwort auf einen Impfstoff ermöglicht die Untersuchung der Gesamtfunktion des Immunsystems. Die Impfung gegen Hepatitis B wird für alle Dialysepatienten empfohlen und die Anti-HBs -Antikörper-Titer werden in der Regel bestimmt, um erfolgreiche Immunisierung zu überprüfen. Somit lässt es sich sagen, dass sofern die Seroprotection erreicht wurde, definiert als Anti -HBs-Antikörpertiter von  $\geq 100$  IU / l, kommt es nach der aktiven Impfung gegen Hepatitis B zur deutlich reduzierten Gesamtmortalität und kardiovaskulärer Mortalität bei Dialysepatienten. Dieser einfache und leicht verfügbare Faktor ermöglicht die Vorhersage über das Überleben der Patienten unabhängig von anderen bekannten wichtigen Parametern wie Alter, Geschlecht oder das Vorhandensein von Diabetes.

## **2 Limitationen der Studie**

Da es sich um eine retrospektive Analyse handelt, bestehen einige limitierende Faktoren in der Beurteilung und Aussagekraft der Studienergebnisse. Die Datenerhebung erfolgte primär aus den Akten der Patienten, wo man teilweise nicht alle für die Studie nötigen Parameter erheben konnte. So mussten mehr als die Hälfte der Patienten aus der Studie genommen werden.

Als Limitationen werden die alten Impfschemata (die aber zum damaligen Zeitpunkt durchaus üblich waren) angesehen, auch die unterschiedlich angewendeten Impfschemata an den jeweiligen Zentren. Weiters dass der

Impftiter als Variable angesehen wird, was statistisch nicht korrekt ist. Außerdem dass es sich um eine Einmalerhebung handelt, mit unterschiedlichem Abstand zum Start der NET, je nach Zentrum davor bzw. danach.

### **3 Ausblick**

In unserer Zeit wird das Thema der Dialyse immer aktueller, wie bereits erwähnt haben wir weltweit mehr als eine Million dialysepflichtiger Patienten und diese Anzahl wird voraussichtlich weiter steigen (1; 2). Es ist also sehr wichtig dieser Patientengruppe besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Es gibt sicherlich schon heute viele verschiedene Ansätze und Vorschläge zur Optimierung der Therapie der Dialysepatienten, einige davon wurde in dieser Diplomarbeit bereits erwähnt.

Unsere Studie zeigte einen weiteren Ansatzpunkt, der darin besteht, eine optimale Impfantwort zu erreichen, welche maßgeblich dazu beiträgt, dass die Patienten eine signifikant bessere Überlebenschance erhalten.

Es bleibt also zu hoffen, dass unsere Studie als Anregung für weitere Forschung und Entwicklung neuer Strategien sowie Ansatzpunkte dienen wird, um die Lebenserwartung und die Lebensqualität der Patienten im Dialyseprogramm weiter zu verbessern und zu optimieren.

## V Literaturverzeichnis

1. Moeller S., Gioberge S. und Brown G. ESRD patients in 2001: global overview of patients, treatment modalities and developing trends. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17: 2071-2076.
2. Lysaght M. J. Maintenance dialysis population dynamics: current trends and longterm implications *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 37-40.
3. Girndt Matthias, Kuhlmann Martin und Köhler Hans. Aktuelle Behandlungsstrategien in Hämodialyse. s.l. : Uni-Med Verlag AG, 2007; 97-103.
4. U.S. Renal Data System: USRDS 2001 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. Bethesda, MD, National Institutes of Health. 2001.
5. Foley R., Parfrey P., Sarnak M. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. s.l. : *Am. J. Kidney Dis.* 1998; 32: 112-119.
6. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int.*, 2009, 76 (Suppl. 113), S1-130.
7. Blacher J., Guerin A., Pannier B. et al. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. s.l. : *Hypertension* 2001; 38: 938-942.
8. Kalantar-Zadeh K., et al. Comparing outcome predictability of markers of malnutrition-inflammation complex syndrome in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19: 1507-1519.
9. Waikar SS, Curhan GC und Brunelli SM. Mortality Associated with Low Serum Sodium Concentration in Maintenance Hemodialysis *Am J Med.* 2011; 124: 77-84.
10. Hadziyannis S. J. Hepatocellular carcinoma and type B hepatitis. *Clin in Gastroenterol.* 1980: 117-134 .
11. Kalayci C., et al. Hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma in the non-cirrhotic liver. *Hepatology.* 1991: 54-59.
12. Kayser F. H., et al. *Medizinische Mikrobiologie.* Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2010: 467-474.

13. Fritze D., et al. Duale Reihe. Innere Medizin. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2012: 591-594.
14. Keller Christine und Geberth Steffen. Praxis der Nephrologie. s.l. : Springer Verlag, 2010: 286-287.
15. Ribot S., Rolhstein M. und Goldblat M. et al. Duration of hepatitis B surface antigenemia (HBsAg) in hemodialysis patients. s.l. : Arch Intern Med, 1979: 178-180.
16. Kohler H. Hepatitis B immunisation in dialysis patients is it worthwhile? Nephrol Dial Transplant. 1994: 1719-1720.
17. Girndt M und Köhler H. Hepatitis B virus infection in hemodialysis patients. s.l. : Semin Nephrol 2002; 22: 340-350.
18. Maier Klaus-Peter. Hepatitis-Hepatitisfolgen. s.l. : Hans Huber Verlag, 2010: 104-111.
19. Hörl Walter und Wanner Christoph. Dialyseverfahren in Klinik und Praxis. s.l. : Georg Thieme Verlag, 2004: 543-548.
20. Debure A., Degos F. und Pol S. et al. Liver disease and hepatic complications infection in renal transplant patients. s.l. : Adv Nephrol, 1988; 17: 375-400.
21. Parfrey P.S., Farge D. und Forbes R.D.C. et al. Chronic hepatitis in end-stage renal disease: Comparison of HbsAg-negative and HBsAg-positive patients. s.l. : Kidney Int, 1985; 28: 959-967 .
22. Holodniy M., Katzenstein D.A. und Israelski D.M. el al. Reduction in plasma human immunodeficiency virus ribonucleic acid after dideoxynucleoside therapy as determined by the polymerase chain reaction. s.l. : J Clin Invest, 1991; 88: 1755-1759.
23. Garson J.A., Brillant S. und Ring C. et al. Hepatitis C viraemia rebound after "successful" interferon therapy in patients with chronic non-A, non-B hepatitis. s.l. : J Med Virol , 1992; 37: 210-214.
24. Jalava T., Ranki M. und Bengtstrom M. et al. JalavaA rapid and quantitative solution hybridization method for detection of HBV DNA in seram. s.l. : J Virol Methods , 1992; 36: 171-180.
25. Scheierniann N., Thraenhart O. und Dermietzel R. et al. ThraenhaPermeability of dialysis membranes for hepatitis-B virus: On the prophylaxis of hepatitis in a hemodialysis centre. s.l. : Dtsch Med Wochenschr , 1977; 102: 10-13.

26. McAdam A.J., Schweitzer A.N. und Sharps A.H. The role of B7 costimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+-T cells. s.l. : Immunol Rev , 1998; 165: 231-247.
27. Doherty C.C., et al. The patient with failing renal function. Hepatitis. In: Oxford Textbook of Clinical Nephrology. Oxford, New York, Tokyo : Oxford University Press, 1998: 1924-1935.
28. Meuer S.C., Hauer M., Kurz P. et al. Selective blockade of the antigen-receptor-mediated pathway of T cell activation in patients with impaired immune responses. s.l. : J Clin Investig , 1987; 80: 743-749.
29. Gerez L., Madar L. und Shkolnik T. et al. Regulation of interleukin-2 and interferon-g gene expression in renal failure. s.l. : Kidney Int, 1991; 40: 266-272.
30. Casciani C.U., de Simone C. und Bonini S. et al. Immunological aspects of chronic uremia. s.l. : Kidney Int, 1978: 45-54 .
31. Beaman M., et al. T cell independent and T cell dependent antibody response in patients with chronic renal failure. s.l. : Nephrol Dial Transplant , 1989; 4: 216-221.
32. Girndt M., Trumpfheller C. und Hunger F. et al. Reduced expression of B7-molecules on monocytes of hemodialysis patients is involved in impaired T-cell activation. s.l. : J Am Soc Nephrol, 1994; 5: 748.
33. Kudo S und Goto H. Intrarenal handling of recombinant human interleukin-1 alpha in rats: mechanism for proximal tubular protein reabsorption.J Interferon Cytokine Res. 1999; 19:1161-1168.
34. Witko-Sarsat V, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. s.l. : J Immunol, 1998; 161: 2524-2532.
35. Mims C. und Dockrell H.M. et al. Medizinische Mikrobiologie Infektiologie mit Virologie und Immunologie. München,Jena : Urban & Fischer, 2006; 34: 555-556.
36. Girndt M., Kohler H., Schiedhelm Weick E. et al. Production of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. s.l. : Kidney Int, 1995; 47: 559-565.
37. Girndt M., Sester U., Sester M. et al. The interleukin-10 promotor genotype determines clinical immune function in hemodialysis patients. s.l. : Kidney Int, 2001; 60: 2385-2391.

38. Girndt M., Heisel O., Kohler H. Influence of dialysis with polyamide versus hemophane hemodialysis on monokines and complement activation during a four month long-term study. s.l. : Nephrol Dial Transplant, 1999; 14: 676-682.
39. Kaul H., Girndt M., Sester U. et al. Initiation of hemodialysis treatment leads to improvement of T cell activation in patients with end stage renal diseases. s.l. : Am J Kidney Dis , 2000; 5: 611-614.
40. Janus Nicolas, et al. Vaccination and chronic kidney disease. s.l. : Nephrology Dialysis Transplantation, 2008: 23.
41. SERVICES, U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN. Recommendations for Preventing Transmission of Infections Among Chronic Hemodialysis Patients. Atlanta : s.n., 2001. S. 6-7. Vol. 50.
42. Mitwalli, A. Responsiveness to hepatitis B vaccine in immunocompromised patients by doubling the dose scheduling. s.l. : Nephron, 1996; 73: 417-420.
43. Peces R., de la Torre M., Alcazar R., Urra J.M. Prospective analysis of the factors influencing the antibody response to hepatitis B vaccine in haemodialysis patients. s.l. : Am J Kidney Dis, 1997; 29: 239-245.
44. Khan A.N., Bernardini J., Rault R.M., Piraino B. Low seroconversion with hepatitis B vaccination in peritoneal dialysis patients. s.l. : Peril Dial Int, 1996; 16: 370-373.
45. Kaperonis N. et al. Long-term effectiveness of intradermal vs intramuscular vaccination against hepatitis B in hemodialysis patients. XXXVI Congress of the European Renal Association European Dialysis and Transplant Association, Madrid, Spain : s.n., 1999.
46. Bergia R., et al. Hepatitis B Vaccination in Uremic Patients: Comparison between Recombinant and Plasma-Derived Vaccine. s.l. : Nephron, 1992; 61: 328.
47. Bruguera M., Cremada M., Rodicio J.L. et al. Immunogenicity of a yeast-derived hepatitis B vaccine in hemodialysis patients. s.l. : Am J Med, 1989; 87: 30-32.
48. Hall A.J. Hepatitis B vaccination: protection for how long and against what? s.l. : Brit Med J, 1993; 307: 176-177.
49. Sherlock S. und Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. Oxford, London, Edinburg, Maiden : Blackwell Science Ltd, 1997: 274-335.

50. Kara IH, Yilmaz ME und Suner A, et al. The evaluation of immune responses that occur after HBV infection and HBV vaccination in hemodialysis patients. s.l. : Vaccine, 2004; 22: 3963-3967.
51. Liu YL, Kao MT und Huang CC. A comparison of responsiveness to hepatitis B vaccination in patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. s.l. : Vaccine, 2005; 23: 3957-3960.
52. Bel'eed K, Wright M und Eadington D, et al. Vaccination against hepatitis B infection in patients with end stage renal disease. s.l. : Postgrad Med J, 2002; 78: 538-540.
53. DaRoza G, Loewen A und Djurdjev O, et al. Stage of chronic kidney disease predicts seroconversion after hepatitis B immunization: earlier is better. s.l. : Am J Kidney Dis, 2003; 42: 1184-1192.
54. Charest AF, McDougall J und Goldstein MB. A randomized comparison of intradermal and intramuscular vaccination against hepatitis B virus in incident chronic hemodialysis patients. s.l. : Am J Kidney Dis , 2000; 36: 976-982.
55. McNulty CA, Bowen JK und Williams AJ. Hepatitis B vaccination in predialysis chronic renal failure patients a comparison of two vaccination schedules. s.l. : Vaccine, 2005; 23: 4142-4147.
56. Jadoul M und Goubau P. Is anti-hepatitis B virus (HBV) immunization successful in elderly hemodialysis (HD) patients? s.l. : Clin Nephrol, 2002; 58: 301-304.
57. Tong NK, Beran J und Kee SA, et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients. s.l. : Kidney Int, 2005; 68: 2298-2303.
58. Miller K.D., Gibbs R.D., Mulligan M.M. et al. Intradermal hepatitis B virus vaccine: immunogenicity and side-effects in adults. s.l. : Lancet, 1983; 2: 1454-1456.
59. Ono K., Kashiwagi S. Complete seroconversion by low-dose intradermal injection of recombinant hepatitis B vaccine in haemodialysis patients. s.l. : Nephron, 1991; 58: 47-51.
60. Marangi A.L., Giordano R., Montanaro A. et al. Hepatitis B virus infection in chronic uremia: long-term follow-up of a two-step integrated protocol of vaccination. s.l. : Am I Kidney Dis, 1994; 23: 537-542.

61. Vlassopoulos D., Arvanitis D., Litis D. et al. Complete success of intradermal vaccination against hepatitis B in advanced chronic renal failure and hemodialysis patients. s.l. : Ren Fail , 1997; 19: 455-460.
62. Morais EO, et al. Intradermal hepatitis B vaccination in patients with advanced chronic renal failure: immunogenicity and follow-up. s.l. : Aliment Pharmacol Ther, 2007.
63. Kurz P., Kohler H., Meuer S. et al. Impaired cellular immune responses in chronic renal failure: evidence for a T cell defect. s.l. : Kidney Int, 1986; 29: 1209-1213.
64. Jungers P., Chauveau P., Loubaris T. et al. Immune response to hepatitis B vaccine in chronic uremic patients. In: Progress in hepatitis B immunization (ed. Coursaget P. and Tong M.J.). s.l. : Colloque INSERM, John Libbey Eurotext, 1990; 194: 187-195.
65. Impfschaden.info. [Online] 16. Dezember 2011. [Zitat vom: 10. Oktober 2013.] <http://www.impfschaden.info/news/439-neuer-impfstoff-gegen-hepatitis-b.html>.
66. Graz Umwelt. [Online] 3. November 2013. <http://www.umwelt.graz.at/cms/ziel/4849410/DE/>.