# CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE VERFAHREN ZUR INAKTIVIERUNG VON PATHOGENEN MIKROORGANISMEN IN ALLOGENEN KNOCHENTRANSPLANTATEN

**HABILITATIONSSCHRIFT**

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

**TRANSFUSIONSMEDIZIN**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Herrn Dr. med. Axel Pruß**

geboren am 4. November 1963 in Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: 11. Dezember 2003

Gutachter:
1. Prof. Dr. med. Bernd-Dietrich Katthagen
2. Prof. Dr. med. Leo Gotzen

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 18. Oktober 2004

**Widmung**

Ich widme diese Schrift meinem Vater, Herrn Oberstudienrat Jürgen Pruß,
ohne dessen unermüdliche Motivation, kritische Nachfragen und
väterlichen Weitblick es nicht zu dieser Arbeit gekommen wäre.

**Inhaltsverzeichnis**


1. Einführung und Zielstellung.....5

1.1 Stellenwert der allogenen Knochentransplantation.....5

1.2 Zielstellung der Arbeit.....8

2. Infektionsrisiken durch allogene Knochentransplantate.....8

2.1 Relevante Infektionserreger .....9

2.1.1 Humanes Immundefizienzvirus (HIV) .....9

2.1.2 Humanes Hepatitis B-Virus (HBV) .....10

2.1.3 Humanes Hepatitis C-Virus (HCV).....11

2.1.4 Weitere relevante Viren, Prionen.....13

2.1.5 Bakterien, Pilze, Sporenbildner und Sporen.....14

2.2 Virusauswahl für Validierungsstudien.....16

2.3 Auswahl nicht-viraler Erreger für die Validierungsstudien.....17

3. Labordiagnostische Maßnahmen zur Erhöhung der viralen Transplantatsicherheit.....18

4. Festlegung der Zielparameter in den Validierungsuntersuchungen.....20

4.1 Virusinaktivierung.....20

4.2 Inaktivierung nicht-viraler Mikroorganismen.....21

5. Ergebnisse - Validierung von Verfahren zur Inaktivierung von klinisch relevanten Erregern in allogenen Knochentransplantaten (Publikationen).....22

5.1 Chemische Behandlung der Knochentransplantate mit Peressigsäure/Ethanol.....22

5.1.1 Validierung der Inaktivierung klinisch relevanter Viren bzw. deren Modellviren.....23

5.1.2 Validierung der Inaktivierung ausgewählter Bakterien, Pilze, Sporen und Sporenbildner.....24

5.2 Sterilisation von Knochentransplantaten mit Gammastrahlen.....25

5.2.1 Validierung der Inaktivierung klinisch relevanter Viren bzw. deren Modellviren.....26

5.2.2 Gammastrahlensensibilität von nicht-viralen Mikroorganismen.....27

5.3 Thermische Behandlung mit feuchter Hitze (Marburger Knochenbanksystem).....28

5.3.1 Validierung der Inaktivierung klinisch relevanter Viren bzw. deren Modellviren.....29

5.3.2 Validierung der Inaktivierung ausgewählter Bakterien, Pilze, Sporen und Sporenbildner.....30

6. Zusammenfassung mit Diskussion der Ergebnisse.....31

7. Literatur.....34

8. Abkürzungsverzeichnis.....40

9. Liste der 5 Publikationen für die kumulative Habilitationsschrift.....42

10. Danksagung.....43

11. Eidesstattliche Erklärung.....44

# 1. Einführung und Zielstellung

## 1.1 Stellenwert der allogenen Knochentransplantation

Die allogene Knochentransplantation ist integraler Bestandteil der Behandlung ausgedehnter Knochendefekte, vor allem bei Prothesenwechseloperationen und Rekonstruktionen nach Knochentumorresektionen. In den USA, dem Land mit den weltweit meisten Knochentransplantationen, beläuft sich die Zahl der verwendeten allogenen Knochentransplantate auf 650.000 bis 800.000 pro Jahr [CDC, 2002]. In Deutschland werden jährlich zur Zeit ca. 75.000 autologe und 25.000 allogene Knochentransplantationen durchgeführt. Für Letztgenannte wird der Bedarf auf ca. 50.000 Transplantate pro Jahr geschätzt [von Garrel, 2003]. Überregionale Gewebebanken, die corticospongiöse Knochentransplantate sowie ein breites Spektrum weiterer musculoskeletaler Transplantate (Bänder, Sehnen, Fascien, Knorpel) bereithalten, werden derzeit nur in Berlin (Gewebebank am Institut für Transfusionsmedizin der Charité) und in Leipzig (Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz) betrieben. Dem gegenüber sind ca. 400 klinikinterne Knochenbanken an unfallchirurgischen bzw. orthopädischen Kliniken angesiedelt. Diese Banken halten hauptsächlich Femurköpfe vor, die bei Totalendoprothesen (TEP)-Operationen steril entnommen werden [Knaepler et al., 1992, 1994; von Garrel, 2003].

Neben allogenen Knochentransplantaten werden autologe Knochengewebe, künstliche und bovine Materialien sowie vitale Knorpel- bzw. Knochenzellkulturen (Tissue Engineering) verwendet.

Die autologen Knochentransplantate gelten zwar als ´golden standard´, sind jedoch aufgrund des eingeschränkten Reservoirs häufig limitiert. Es muss betont werden, dass die autologe Knochentransplantation durch den erforderlichen Zweiteingriff am Beckenkamm mit teils erheblicher und langfristiger neurologischer Symptomatik einhergehen kann [Wippermann et al., 1997].

Im Vergleich zu künstlichen Knochenersatzmaterialien, wie Knochenzement oder Hydroxylapatit-Keramiken, aber auch bovinem Material liegt der wesentliche Vorteil allogener Knochentransplantate in deren Fähigkeit, osteokonduktiv und teilweise osteoinduktiv zu wirken. Diese natürlichen Knochentransplantate dienen als Leitsystem für eine knöcherne Durchbauung und bieten somit die ideale, der physiologischen Morphologie entsprechende Architektur. Von wesentlicher Bedeutung ist dabei die Resorbierbarkeit von Transplantatbestandteilen, da dem Knochenaufbau über Osteoblasten in aller Regel ein durch Osteoklasten gesteuerter Knochenabbau vorausgeht. In diesem Zusammenhang wird die Proliferation von Mesenchymzellen und deren Weiterdifferenzierung zu Osteoblasten durch frei werdende Substanzen, unter anderem durch sogenannte ´bone morphogenetic proteins´ (BMP) [Urist, 1971], angeregt. Weitere Vorteile der allogenen Knochenübertragung liegen in den zur Verfügung stehenden Ressourcen (Knochenbanken) und dem möglichen ´en bloc´-Einsatz. Selbst große Defekte (bis 10 cm) heilen in ersatzstarken La-

gern meist komplikationslos ein [Regel et al., 1992]. Schließlich können insbesondere durch überregionale Gewebebanken, neben allogenen Knochentransplantaten, auch andere musculoskeletale Transplantate zur Verfügung gestellt und somit der Bedarf für ein ein breites operatives Spektrum abgedeckt werden (Tabelle 1).

Die Bemühungen, durch Verfahren des Tissue Engineering alternative Transplantatformen zu entwickeln, beruhen zumeist auf der Anzüchtung autologer Knorpel- bzw. Knochenzellen, die mittels geeignetem Carrier retransplantiert werden. Infolge der bisher fehlenden Standardisierung der Verfahren sowie der hohen Kosten können diese Therapieformen derzeit nur bei bestimmten Indikationen (z.B. im Kniegelenk oder im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich) in sehr wenigen Zentren durchgeführt werden. Daher ist in diesem Zusammenhang die Weiterentwicklung und Optimierung der allogenen Knochentransplantate von großer Bedeutung.

Tabelle 1. Allogene musculoskeletale Transplantate und Indikationen [Pruss et al., 2002]

| Transplantat | Indikationen |
|---|---|
| Spongiöse Knochengewebe | • TEP-Wechsel in Hüft- und Kniegelenk,<br>• Verfüllung bei zystischen Tumoren und „tumor-like lesions“,<br>• Posttraumatische Defekte,<br>• Rekonstruktion der Hüftpfanne,<br>• ventro-dorsale-Fusion bei LWS-Instabilitäten,<br>• Umstellungsosteotomien der Tibia und des Femurs |
| Corticale Knochengewebe | • Wirbelkörperersatz nach Entzündung oder Tumor, Ersatz peripheren Knochens bei unterschiedlichen Defektsituationen<br>• „greffe anterior“ - ventrale Stabilisierung bei schweren Skoliosen<br>• Rekonstruktion von Knochendefekten, v.a. Endoprothetik, Stabilisierung bei zystischen Läsionen in biomechanisch belasteten Bereichen (Femur bei fibröser Dysplasie), Knochendeckel bei Knochenzysten<br>• Ventralisation der Tuberositas tibiae<br>• Korrekturosteotomien<br>• OP nach Eden-Hybinette bei habitueller Schultergelenksluxation |
| Bandgewebe | • Ersatz bei Ruptur des Ligamentum patellae<br>• Mediale Seitenbandinstabilität der Kniegelenkskapsel |
| Sehnengewebe | • Kreuzbandplastiken |
| Fasziengewebe | • Mediale Seitenbandinstabilität der Kniegelenkskapsel |
| Knorpelgewebe | • Plastische Chirurgie, Gelenksarthrosen |

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung humaner Knochentransplantate dienen, neben Femurköpfen vom Lebendspender, vor allem Femura, Tibiae, Wirbelkörper und Beckenkamm. Diese

werden im Rahmen einer Multiorganspende oder bei Gewebespendern nach standardisierten Verfahren entnommen. Das Knochengewebe wird nach der Entnahme tiefgefroren und in der Regel bei ≤ -70 °C bis zur Transplantation gelagert. Überregionale Gewebebanken unterziehen die Gewebe zum Teil einer Gefriertrocknung (Restfeuchte unter 6%) und garantieren somit eine Lagerzeit von bis zu 5 Jahren.

Die Lebend- oder Multiorgan-/Leichenspende von Knochengewebe sowie die diesbezüglichen Verfahren unterliegen strikten Regulationen. Die ´Richtlinien zum Führen einer Knochenbank´ [Bundesärztekammer, 2001] legen Normen für die Auswahl von Lebend- und - mit Einschränkungen - von Leichenspendern fest, die sich in vergleichbarer Form auch in den internationalen Standards der ´American Association of Tissue Banks´(AATB), der ´European Association of Tissue Banks´ (EATB) und der European Association of Musculo Skeletal Transplantation´ (EAMST) [EATB/EAMST, 1997] wiederfinden. Die wesentlichsten Kriterien sind:

- eine ausführliche Spenderanamnese mit Ausschlusskriterien, die sich an der Richtlinie der Bundesärztekammer zur „Gewinnung und Anwendung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ [Bundesärztekammer, 2000] orientiert und somit vor allem der Erkennung und Vermeidung von Infektionsrisiken dient,
- die Zustimmung des Spenders oder bei Verstorbenen alternativ die Zustimmung der Angehörigen zur Knochengewebsspende,
- klinische Untersuchung des Spenders mit Schwerpunkt Infektionen und parenteraler Drogenmissbrauch,
- Laboruntersuchungen auf Antikörper gegen das Humane Immundefizienzvirus (Anti-HIV-1/2), das Hepatitis C-Virus (Anti-HCV) und das Hepatitis B-Virus (Anti-HBc, bei positivem Ergebnis auch Anti-HBs und HBV-Genom und zusätzlich HBs-Antigen), auf Antikörper gegen *Treponema pallidum* (TPHA) und die Bestimmung der ALAT (Alaninaminotransferase) als Surrogatmarker sind zwingend vorgeschrieben. Für Knochenentnahmen bei Verstorbenen sind zusätzlich Blutuntersuchungen mit noch empfindlicheren Testmethoden durchzuführen, die zur Zeit den Nachweis von HIV-, HCV- und HBV-Genom mittels Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT, z.B. PCR) umfassen.
- Nach einer Quarantänelagerung der Gewebe erfolgt eine Zweittestung des Lebendspenders frühestens sechs Wochen nach der Transplantatentnahme. Die zweite Testung umfasst HBs-Antigen, Anti-HBc, HBV-DNA, Anti-HIV 1/2, HIV-RNA, Anti-HCV und HCV-RNA. Verlängert man die Quarantänefrist auf sechs Monate, so kann auf die Testung der HIV-RNA und HBV-DNA verzichtet werden. Ist das erste und zweite Testergebnis von HBV, HCV und HIV negativ, kann das Transplantat verwendet werden. Knochen von Multiorganspendern stellen eine Ausnahme dar, da nur ein indirekter Nachweis möglich ist.

So sind die Organempfänger, z.B. einer Niere, 6 Monate nach der Transplantation auf HBs-Antigen, Anti-HBc, HBV-DNA, Anti-HIV 1/2, HIV-RNA, Anti-HCV und HCV-RNA zu testen.

Auf eine Zweittestung kann verzichtet werden, wenn ein validiertes chemisches oder physikalisches Verfahren zur Inaktivierung von HIV, Hepatitis B-Virus und Hepatitis C-Virus eingesetzt wird. Neben einer zusätzlichen Sicherheit hinsichtlich anderer mikrobieller Kontaminationen der Gewebe wird durch die Inaktivierung die Lagerfrist der Gewebe verkürzt und die Logistik (erneute Einbestellung der Patienten und zusätzliche Labortests entfallen) vereinfacht. Darüber hinaus sind diese Validierungen in Deutschland unter Bezug auf §§ 2 und 3 AMG [Bundesgesetzblatt, 1998], d.h. bei Abgabe des Transplantates als Fertigarzneimittel, geforderter Standard. Eine Definition der Anforderungen an ein validiertes Verfahren zur Virusinaktivierung in Knochentransplantaten liegt bisher nicht vor.

## 1.2 Zielstellung der Arbeit

Die in dieser Arbeit dargestellten wissenschaftlichen Untersuchungen beschäftigen sich vor allem mit der Frage, unter welchen Umständen und Bedingungen die Validierung von Virusinaktivierungsverfahren zu erfolgen hat und welche Zielparameter zu definieren sind. Daraus ableitend werden Bedingungen festgelegt, die zu einer größtmöglichen Infektionssicherheit der Knochentransplantate führen. Dabei wurden Inaktivierungverfahren (Peressigsäure/Ethanol, Gammabestrahlung, feuchte Hitze), die in Knochenbanken weltweit am häufigsten eingesetzt werden, an ausgewählten Viren untersucht. Der bisherige Kenntnisstand über die Inaktivierungspotenz dieser Verfahren in Knochengeweben ist nur durch wenige Untersuchungen belegt und beruht größtenteils auf Erfahrungswissen. Das Peressigsäure-Verfahren sowie die Hitzeinaktivierung sind ergänzend mit klinisch relevanten Bakterien, Pilzen, Sporenbildnern und Sporen validiert worden.

Vor Darstellung und Diskussion der eigenen Ergebnisse, die in Publikationen in internationalen Journals veröffentlicht worden sind (siehe 5.), wird der aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisstand zu Infektionsrisiken von Knochentransplantaten und zur Rolle der Infektionsdiagnostik dargelegt.

# 2. Infektionsrisiken durch allogene Knochentransplantate

Wissenschaftliche Fragestellungen zur allogenen Knochentransplantation beschäftigen sich vor allem mit klinisch-funktionellen Aspekten sowie den potenziellen Infektionsgefahren (Übertragungen von Viren und bakteriellen Krankheitserregern) für den Transplantatempfänger.

## 2.1 Relevante Infektionserreger

### 2.1.1 Humanes Immundefizienzvirus (HIV)

Das zur Gruppe der Retro-Viren (Familie Lenti-Viren) gehörende Humane Immundefizienzvirus (HIV, Typ 1 mit 3 Subtypen: M(ajor), N(ew), O(utlier), Subtyp M mit Varianten A-I; Typ 2) wurde Anfang der achtziger Jahre erstmals beschrieben und 1983 durch die Arbeitsgruppen von Montagnier bzw. Gallo isoliert [Barre-Sinoussi et al., 1983; Popovic et al., 1984]. Es handelt sich um ein ca. 100 nm großes, umhülltes, einzelsträngiges RNA-Virus. Das Virus ruft das erworbene Immundefektsyndroms (AIDS) hervor, welches durch opportunistische Infektionen (Befall von CD4-Zellen mit zunehmender Ausschaltung des Immunsystems), die im Endstadium zum Tod führen, gekennzeichnet ist. Man schätzt die derzeitige weltweite Prävalenz auf ca. 30-40 Millionen Menschen. Dabei sind allein in Afrika 15 Millionen Menschen infiziert. Die Prävalenzen in Asien liegen bei 6 Millionen, in Lateinamerika bei 1,8 Millionen und in den USA/Europa bei 1,5 Millionen. In Osteuropa wird eine hohe Dunkelziffer postuliert [Modrow & Falke, 1998; RKI, 2002].

Die Übertragung des Virus erfolgt vor allem durch homo- und heterosexuellen Verkehr, i.v.-Drogenmißbrauch, intrauterine/konnatale Infektion, Verletzungen und andere Übertragungen von infektiösem Blut (ungetestete Transfusionen/Transplantationen), Samen, Speichel und anderen Körpersekreten. Einzelheiten der Diagnostik werden unter Punkt 3. erläutert und diskutiert. Die derzeitige Therapie besteht in antiviralen Kombinationstherapien (z.B. HAART) und in der Behandlung der opportunistischen Infektionen (u.a. CMV-Chorioretinits, CMV-Pneumonie, HSV-Infektionen, Zoster multiplex, orale Haarleukoplakie) bzw. der AIDS-assoziierten Krankheitsbilder (u.a. Enzephalopathie, Wasting-Syndrom, Kaposi-Sarkom, B-Zell-Lymphom, Zervix-Karzinom). Aufgrund der Heterogenität des Virus (Typen, Subtypen, Varianten) ist eine Impfung derzeit noch nicht verfügbar.

Die Übertragung von HIV ist eines der zentralen Themen in der gesamten Transplantationsmedizin und somit auch in der allogenen Knochentransplantation. In den USA wurde 1988 erstmals über eine HIV-Übertragung durch ein steril entnommenes allogenes Knochentransplantat, welches 1984 im Rahmen einer Wirbelsäulen-OP eingesetzt wurde, berichtet [CDC, 1988]. Das Transplantat wurde bei -80°C über 24 Tage gelagert und keinem Sterilisationsprozess unterzogen, der Spender nicht auf HIV-Antikörper untersucht.

1985 wurden einem Multiorganspender, der so frisch mit HIV-infiziert war, dass die Tests noch nicht positiv waren (´diagnostischen Fenster´), insgesamt 58 Gewebs- und Organtransplantate, darunter 28 Knochentransplantate, entnommen. 25 der Transplantate wurden lyophilisiert und mit 30%igem Ethanol behandelt. 3 Transplantate wurden weder desinfiziert noch lyophilisiert. Die drei Empfänger wurden mit HIV-1 infiziert [Simonds et al., 1992].

Auch in Deutschland wurden HIV-Übertragungen durch Knochentransplantate beschrieben. Bei einem männlicher Spender wurden 1984 insgesamt 16 Knochentransplantate unter sterilen Bedingungen entnommen, keiner Virusinaktivierung unterzogen und bei -80°C konserviert. Ein HIV-Test konnte nicht durchgeführt werden, da zu dieser Zeit keine geeigneten Tests zur Verfügung standen. Im Zeitraum von November 1984 bis Mai 1985 erhielten 12 Patienten Transplantate des Spenders und vier dieser Empfänger wurden mit HIV infiziert [Schratt et al., 1996].
Seither wurden in der internationalen Literatur keine weiteren Übertragungsfälle geschildert. Es ist jedoch davon auszugehen, dass das Infektionsrisiko trotz umfassender Sicherheitsmaßnahmen (Labordiagnostik, Anamnese/Klinik, Inaktivierungsverfahren) insbesondere im afrikanisch/asiatischen Raum weiterhin vorhanden ist.
Das Risiko einer HIV-Übertragung durch Bluttransfusionen wird in Deutschland auf der Grundlage der berichteten Übertragungsfälle auf < 1:5.000.000 [Graul et al, 2003; Bein & Sachs, 2003] geschätzt. Eine weitere Verminderung auf ein Restrisiko von < 1: 11.000.000 ist durch die allgemeine Einführung der NAT-Testung (Blutspendertestung auf HIV-Genom ab 01.05.2004) zu erwarten [Seifried et al., 2002; Caspari & Gerlich, 2003]. Dieses Risiko dürfte mit dem für Gewebespender weitestgehend vergleichbar sein. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Organ-/Gewebespender in der Regel ´Erstspender´ sind und somit in diesem Kollektiv eine erhöhte Prävalenz zu erwarten ist [Offergeld et al., 2003; Strong, 2003].

### 2.1.2 Humanes Hepatitis B-Virus (HBV)

Das humane Hepatitis B-Virus gehört zu den Hepadnaviren und besitzt ein (teilweise) doppelsträngiges DNA-Genom. Dieses Virus kann unter geeigneten Umständen die Hepatitis B auslösen, die auch, infolge der Übertragungswege, als „Serumhepatitis“ oder „Transfusionshepatitis“ bekannt ist. Erste klinische Beschreibungen von sog. „Ikterus-Epidemien“, deren Ursache aus heutiger Sicht übertragene Hepatitis B-Viren waren, reichen in die Jahre 1885 (Pocken-Impfaktion) und 1938 (Masern-Impfungen) zurück. Die infektiösen Viruspartikel sind ca. 42 nm groß, sphärisch und besitzen eine Lipidhülle. Sie werden nach D. S. Dane, der sie 1970 entdeckte, auch ´Dane-Partikel´ genannt. In der aus der Membran des endoplasmatischen Reticulums entstandenen Hüllmembran des Virus ist das HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) als virales Protein, welches auch als freies HBsAg-Partikel (ca. 20 nm) im Serum vorkommt, verankert. Der Nachweis von HBsAg ist eine der grundlegenden diagnostischen Verfahren zur Detektion einer HBV-Infektion. Im Inneren befindet sich ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 24 nm. Dieses besteht aus 180 Einheiten des HBcAg (hepatitis B virus core antigen) und enthält das DNA-Genom. Der Nachweis von Antikörpern gegen dieses Protein wird ebenfalls bei der HBV-Diagnostik genutzt (Näheres unter 3.).

Heutzutage sind weltweit etwa 300 Millionen Menschen an einer chronischen Hepatitis B erkrankt. In Deutschland gibt es etwa 50.000 Neuinfektionen/Jahr, ca. 0,5% der Bevölkerung sind HBsAg-positiv [Hahn et al., 2001]. Eine besonders hohe Durchseuchung findet sich bei i.v. Drogenabhängigen, Homosexuellen und Prostituierten. Die Übertragung erfolgt in der Regel durch kontagiöses Blut und Blutprodukte. Ungenügend sterilisierte nicht-ärztliche Instrumente (z.B. Tätowierungsnadeln, Piercings), der Inhalt mehrfach benutzter Ampullen (z.B. Heparine), aber auch Sperma, Speichel, Tränenflüssigkeit und andere Sekrete können potenziell infektiös sein. Zielorgan der Viren ist die Leber (Zielzellen: Hepatozyten). Durch die daraus folgende Immunreaktion wird das Krankheitsbild (Abdomialbeschwerden, Fieber, Gelenkbeschwerden, Exantheme, Ikterus) ausgelöst. Der Verlauf kann entweder fulminat mit akutem Leberversagen auftreten, ausheilen oder in eine chronische Form (aktiv oder persistierend) übergehen. Als eine der gefürchtetsten Spätfolgen ist die Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms bekannt.
Obwohl bisher nur eine HBV-Übertragung durch Knochentransplantate bekannt wurde [Shutkin, 1954], muss dieses Virus zweifelsohne, insbesondere aufgrund der hohen Viruskonzentration in der infektiösen Phase (bis $10^{10}$ geq/ml) als relevant für die Risikobewertung von Knochengewebsspendern angesehen werden. Für die Gefahr Blut-assoziierter Infektionen im ´diagnostischen Fenster´ spricht auch ein vor kurzem bekannt gewordener Fall einer HBV-Übertragung durch ein Erythrozytenkonzentrat. Der Spender der Konserve war HBsAg-negativ getestet worden. Die HBV-DNA-Untersuchung der Rückstellprobe mittels NAT war positiv (ca. 2.000 copies/ml). Der Test auf HBsAg wurde erst 2 Monate nach der Spende des infektiösen Erythrozytenkonzentrates grenzwertig positiv [Meisel et al., 2003].
Das derzeitige Risiko, in Deutschland durch eine Transfusion mit dem HBV infiziert zu werden, liegt auf der Grundlage der berichteten Übertragungsfälle zwischen 1:100.000 und 1:1.000.000 [Graul et al., 2002; Bein & Sachs, 2003; Caspari & Gerlich, 2003].

### 2.1.3 Humanes Hepatitis C-Virus (HCV)

Nach Aufdeckung der pathophysiologischen Zusammenhänge der Hepatitis A und der Hepatitis B und molekularbiologischer bzw. serologischer Beschreibung der diesen Erkrankungen zugrundeliegenden Viren, verblieben eine Vielzahl parenteral übertragbarer sog. NonA/NonB-Hepatitiden, deren ursächliches Agens zunächst nicht gefunden werden konnte. Erst 1989 wurde im Nachgang von Schimpanseninfektionen mit nachfolgender DNA-Isolierung und -Charakterisierung ein Antigen exprimiert, das mit Seren von chronisch Infizierten mit NonA/NonB-Hepatitis reagierte. Die entsprechende cDNA wurde sequenziert und das (nunmehr als Hepatitis C-Virus bezeichnete) Virus als neues Genus der Flaviviridae identifiziert. Das Hepatitis C-Virus ist ein einzelsträngiges RNA-Virus von ca. 60-70 nm Größe. Es besteht aus einem

Kapsid und einer Hülle. Eine eindeutige morphologische Darstellung ist bis heute nicht gelungen. Wie HBV wird das HCV parenteral übertragen. Risikogruppen sind erneut i.v.-Drogenabhängige, Dialysepatieten, Homosexuelle und Gefängnisinsassen. Die Übertragung erfolgt vor allem durch infektiöses Blut und Blutprodukte. Auch Sperma, Speichel und andere Exsudate enthalten geringe Viruskonzentrationen. In Deutschland sind etwa 0,6%, in den USA 1,5-4,4 % der Bevölkerung seropositiv. Pro Jahr werden in Deutschland 20.000-50.000 Neuinfektionen beobachtet. Die Hepatitis C-Infektion verläuft zumeist klinisch stumm. Klinisch sichtbare Verläufe sind in der Regel leichter als die der Hepatitis B, jedoch ist auch hier ein Übergang in Zirrhose und primäres Leberzellkarzinom möglich. Als zentraler labordiagnostischer Test wird ein IgG-ELISA gegen Struktur- und Nicht-Struktur-Antigene (C100, C33, C22) eingesetzt. Aufgrund des langen diagnostischen Fensters besitzt die HCV-NAT große Bedeutung, wobei auch diese nicht letzte Sicherheit bietet (siehe 3.). Therapeutisch wird neben einer allgemein symptomatischen Therapie insbesondere alpha-Interferon, meist in Kombination mit Ribavirin eingesetzt [Hahn et al., 2001].
1992 wurde erstmals eine HCV-Übertragung durch ein allogenes Knochentransplantat beschrieben. Die Spenderin des Knochentransplantates infizierte sich 1985 durch Transfusion eines infektiösen Frischplasmas mit HCV. 1990 wurde dieser Patientin im Rahmen einer Hüft-Operation ein Femurkopf entnommen und als Transplantat nach 8 Wochen Kältekonservierung ohne Virusinaktivierung weiterverwendet. Der Empfänger des Femurkopf-Transplantates wurde kurze Zeit später Anti-HCV positiv [Conrad et al., 1995].
Ein weiterer HCV-Übertragungsfall wurde vor kurzem in den USA publiziert. Hier wurden einem anti-HCV-negativ getesteten Multiorganspender im Jahr 2000 insgesamt 91 Organ- bzw. Gewebetransplantate entnommen. Hiervon wurden 40 Patienten mit Transplantaten versorgt. Eine HCV-Infektion ließ sich bei den Organempfängern sowie bei 5 Gewebeempfängern (1 Vena saphena-Empfänger, 1 Sehnenempfänger, 3 Knochen/Sehnen-Empfänger) nachweisen. Die im Juli 2002 untersuchte Rückstellprobe des Spenders war in der HCV-Genom-Untersuchung (AMPLICOR HCV Test, Version 2.0, Roche) positiv, im Antikörper-Test (ORTHO HCV Version 3.0 ELISA) jedoch unverändert negativ [CDC, 2003]. Bei den 16 Empfängern, die bestrahlte Knochentransplantate (Dosis: 15 kGy) erhalten hatten, wurde keine HCV-Infektion festgestellt. Eigene Untersuchungen weisen daraufhin, dass diese Dosis in Anbetracht des $D_{10}$-Wertes von Flaviviren (BVDV: <3 kGy) für eine Abreicherung um $5\log_{10}$-Stufen hinreichend ist und somit die Bestrahlung mit großer Wahrscheinlichkeit bei diesen Empfängern die Infektion verhindert hat [Pruss et al., 2002].
Nach Einführung der HCV-NAT für Blutspender im April 1999 liegt das Risiko einer HCV-Übertragung durch Blutprodukte in Deutschland oberhalb von 1:13.000.000 [Seifried et al., 2002, Caspari & Gerlich, 2003; Graul et al., 2003].

### 2.1.4 Weitere relevante Viren, Prionen

Schließlich sei auf Viren hingewiesen, die durch Blut und damit auch durch Knochentransplantate potenziell übertragen werden und schwere klinische Verläufe hervorrufen können.

Das humane Parvovirus B19, ein nicht-umhülltes, kleines (22 nm), einzelsträngiges DNA-Virus, kann beim Menschen die Ringelröteln hervorrufen. Bei Infektionen in utero können die Parvoviren einen Hydrops fetalis (10-15% aller Fälle) bzw. einen Abort auslösen. Persistierende Infektionen sind Ursache von Arthritis, Arthropathie und aplastischer Anämie. Die Übertragung erfolgt durch Tröpfcheninfektion, als zellulärer Rezeptor wurde die Blutgruppensubstanz P beschrieben. Demzufolge findet man das Virus vor allem in Erythroblasten, deren virusbedingte Zerstörung zu einer temporären, ca. 10 Tage andauernden Hemmung der Erythropoese mit Hämolyse und nachfolgender Anämie führt. Zentrales pathogenetisches Element ist somit ein $O_2$-Mangel. Das Virus ist gegenüber Umwelteinflüssen und Inaktivierungsmaßnahmen sehr resistent. Die Diagnostik erfolgt mittels serologischer und molekularbiologischer Tests. Die Therapie ist symptomatisch, bei niedrigem Hb-Wert (<10 g/dl) kann eine intrauterine Transfusion notwendig werden.

Das Risiko einer Übertragung von Parvoviren ist in Deutschland aufgrund von regelmäßigen Epidemien (ca. alle 4-5 Jahre), bei denen jeder tausendste bis zwanzigtausendste Spender PCR-positiv ist, relativ hoch [Hahn et al., 2001; Caspari & Gerlich, 2003]. Da Parvoviren insbesondere im Knochenmark persistieren, stellt die Übertragung markhaltiger Knochentransplantate, bei denen keine Entfernung der Blutzellen erfolgt, ein besonderes Infektionsrisiko dar. Die Übertragung des humanen Parvovirus B19 durch Blutprodukte wurde bereits mehrfach beschrieben [Koenigbauer et al., 2000; Matsiu et al., 1999]. Berichte über Infektionen durch Knochentransplantate liegen bis dato nicht vor, das potenzielle Risiko ist aufgrund der Zielzellen der Viren jedoch nicht unerheblich.

Das ca. 28 nm große, nicht-umhüllte Hepatitis A-Virus (HAV) enthält eine Einzelstrang-RNA und gehört der Gruppe der Picornaviridae an. Es bleibt außerhalb des menschlichen Körpers unter normalen Umweltbedingungen für mindestens 4 Wochen infektiös. Das Hepatitis A-Virus ist ätherstabil und sehr hitzeresistent. Für die Inaktivierung ist eine Hitzeeinwirkung von 100°C für 5 Minuten nötig. Eine 30-minütige Behandlung bei 60°C ist nicht ausreichend. Das Virus überträgt sich fäkal-oral, z. B. durch Lebensmittel und Trinkwasser. Es verursacht eine in den meisten Fällen ohne Spätfolgen ausheilende Hepatitis [Hahn et al., 2001]. Übertragungen durch Knochentransplantate sind bis dato nicht bekannt.

Das humane Cytomegalievirus (CMV) ist ein ca. 180 nm großes doppelsträngiges DNA-Virus, das zur Gruppe der Herpes-Viren gehört. Die Übertragung des Virus erfolgt zumeist durch Tröpfcheninfektion, ist aber auch über Bluttransfusionen bzw. Organtransplantationen möglich.

Die Leukozytendepletion von Blutkonserven (3-4 log) führt zu einer erheblichen Abreicherung von CMV. Obwohl der Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit von einer weitestgehenden Gleichwertigkeit von Leukozytendepletion und Anti-CMV-Testung ausgeht [Arbeitskreis Blut, 2000], sollten die transfundierten Blutprodukte bei Risikopatienten (Feten, Frühgeborene, Anti-CMV negative Immunsupprimierte nach Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation) zusätzlich einen Antikörper-negativen CMV-Status aufweisen. In Deutschland sind ca. 55% der Bevölkerung infiziert. Die Erkrankung verläuft mit einem Mononukleose-ähnlichem Bild und kann zusätzlich mit einer interstitiellen Pneumonie einhergehen. Besonders schwerwiegend sind intrauterine Infektionen, die zu Entwicklungsstörungen des Fetus führen können sowie die Infektion von immunsupprimierten Patienten, bei denen insbesondere die CMV-Pneumonie gefürchtet ist. Therapeutisch ist der Einsatz von Ganciclovir und Cidofovir erfolgversprechend. Aufgrund der hohen Durchseuchung der Bevölkerung sowie des zumeist blanden Verlaufes der Infektion besitzt die CMV-Übertragung bei der allogenen Knochentransplantation eine untergeordnete Rolle. Jedoch sollte insbesondere bei Übertragung großer, blutzellhaltiger Transplantate in CMV-Ak-negative Schwangere bzw. immunsupprimierte Patienten (cave: Reaktivierung) auf den CMV-Status (Antikörperbestimmung) des Gewebespenders geachtet werden.
Das Humane T-Zell-Leukämie-Virus 1 (HTLV-1, Retro-Virus, behülltes einzelsträngiges RNA-Virus) spielt in Deutschland aus epidemiologischer Sicht nur eine sehr untergeordnete Rolle, jedoch wurde durch eine schwedische Arbeitsgruppe eine Übertragung durch gefrierkonservierten allogenen Knochen berichtet [Sanzén und Carlsson, 1997].
Die Übertragung von Prionen durch allogene Dura mater-Transplantate ist seit längerem bekannt [CDC, 1987, 1989], jedoch wurde über eine solche Infektion durch allogene Knochentransplantate oder durch Bluttransfusionen bisher nicht berichtet [Bein & Sachs, 2003]. Des weiteren wird das vCJD/CJD-Übertragungsrisiko durch Knochengewebe durch die WHO derzeit als sehr niedrig eingestuft [WHO, 2003].

### 2.1.5 Bakterien, Pilze, Sporenbildner und Sporen

Die Übertragung von nicht-viralen Erregern durch allogene Knochentransplante ist unter anderen Gesichtspunkten zu betrachten. Eine Virusübertragung ist in der Regel nur dann möglich, wenn der Spender infiziert ist, eine Virämie aufweist und mit dem Transplantat eine hinreichende Menge infektiösen Virus (zumeist im Blut bzw. in Blutzellen) übertragen wurde (Primärinfektion). Nicht-virale Erreger können auch durch Kontaminationen vor, während oder nach der Entnahme in das Transplantat gelangen (Sekundärinfektion) [Tomford et al., 1995; Eastlund, 2002]. Dieser Umstand erfordert ein möglichst keimarmes Vorgehen bei der Explantation und Bearbeitung der Gewebe sowie ein mikrobiologisches Monitoring [Forsell & Liesman, 2000; Martinez,

2002; Bankowski, 2002]. Dies ist insbesondere dann zu fordern, wenn kein validiertes Inaktivierungsverfahren eingesetzt wird.

Eine 1981 durchgeführte Untersuchung von Infektionen bei 303 allogenen Knochentransplantationen ergab 21 Infektionsfälle (6,9%). Das ermittelte Erregerspektrum umfasste *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und eine *Enterobacter*-Spezies. Nur in einem Fall stimmten Erregerspezies von Transplantat und Patient überein [Tomford et al., 1981]. Eine Folgestudie zeigte transplantatbedingte Infektionen in 3 von 324 Transplantationen [Tomford et al., 1990].

1988 wurden 283 Patienten mit einer allogenen Knochentransplantation (gefrierkonservierte große Allografts) auf Infektionen überprüft. Nach der Knochentransplantation entwickelten 33 Patienten (11,7%) eine bakterielle Infektion. 55% der Erreger waren grampositiv (u.a. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* und α-hämolysierende Streptokokken), 18% gramnegativ (u.a. *Escherichia coli, Bacteroides fragilis, Proteus*- und *Pseudomonas*-Arten) und 27% lagen als Mischkultur vor. Ein direkter Zusammenhang zwischen Infektion und kontaminiertem Transplantat konnte jedoch nur in einem Fall (*Pseudomonas*-Spezies) sicher belegt werden. In zwei weiteren Fällen war der Zusammenhang wahrscheinlich, jedoch nicht gesichert [Lord et al., 1988].

Ein früher Fall einer Bakterienübertragung durch allogene Knochentransplantate ist die 1953 berichtete Übertragung von *Mycobacterium tuberculosis*. Dem Spender wurden im Rahmen einer TBC-bedingten Thorakotomie Rippen entnommen, die als Knochentransplantate weiter verwendet wurden [James, 1953]. Floride bzw. klinisch manifeste Tuberkulosen gelten heute als Ausschlusskriterium für Knochenspender [Bundesärztekammer, 2001].

Eine dänische Arbeitsgruppe untersuchte den postoperativen Verlauf von 423 allogenen Femurkopf-Empfängern. Dabei wurden insgesamt 7 Infektionen (1,7%) durch allogene Knochentransplantate festgestellt. Das Erregerspektrum umfasste alpha-hämolysierende Streptokokken, *Bacillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella* spp. und *Micrococcus* spp. Die bei der Explantation vorgenommenen Abstrichkulturen waren negativ [Nielsen et al., 2001]. Die Nachweise von *Bacillus*- und *Micrococcus*-Spezies deuten auf sekundäre Kontaminationen hin.

In jüngster Zeit häufen sich leider Berichte über Übertragungen von nicht-viralen Mikroorganismen durch allogene musculoskeletale Transplantate. Eine schottische Arbeitsgruppe berichtet im Rahmen der Aufarbeitung von 98 Femurkopftransplantaten eine Infektionsrate von 12,2 %, wobei in zwei Fällen ein kontaminiertes Knochentransplantat als Ursache der postoperativen Infektion gesichert wurde [Sutherland et al., 1997]. In einer Studie aus dem Jahr 2002, die 250 Empfänger von allogenen Knochentransplantaten umfasste, wurden 4 transplantat-assoziierte Infektionen (1,6%) nachgewiesen. Das Erregerspektrum umfasste in drei Fällen *Staphylococcus aureus* sowie einmal *Pseudomonas aeruginosa*. Die Transplantate wurden vor der Operation lediglich in Antibiotikalösungen gespült [Liu, 2002].

Im November 2001 erlag ein Patient nach einem rekonstruktiven Eingriff am Knie, der die Transplantation eines allogenen Femurkondylus erforderte, 4 Tage postoperativ einem schweren septischen Schock. Sowohl die Blutkultur als auch die Nachuntersuchung von Rückstellmustern des Knochengewebsspenders isolierten *Clostridium sordelli*. Ein weiterer Patient, der Knochengewebe (Femurkondylus mit Meniskus) desselben Spenders erhielt, entwickelte ebenfalls eine Infektion mit *Clostridium sordelli*. Das Spendergewebe wurde unter sterilen Bedingungen 23,5 Stunden post mortem entnommen. Der Spender wurde gekühlt gelagert und hatte keine anamnestischen bzw. klinischen Hinweise für eine Clostridium-Infektion. Weitergehende Untersuchungen der CDC in US-amerikanischen Gewebebanken zeigten, dass im Zeitraum 2000-2002 insgesamt 26 Patienten (die o.g. 2 Fälle eingeschlossen) transplantatbedingte Infektionen erlitten. 13 Patienten wurden durch allogene Sehnen (8), Femurkondylen (2), Spongiosa (2) und Menisci (1) mit *Clostridium septicum*, *Clostridium sordelli, Staphylococcus aureus* bzw. *Enterococcus faecium* infiziert. Alle Gewebe wurden aseptisch entnommen, jedoch keinem terminalen Desinfektions- bzw. Sterilisationsverfahren unterzogen. Weitere 11 Patienten waren mit Gram-negativen-Spezies (u.a. *Pseudomonas aeruginosa, Hafnia alvei, Citrobacter werkmanii youngae* und *Klebsiella oxytoca*) infiziert worden. Bei zwei Patienten konnte keine anschließende Bewertung vorgenommen werden. Die übertragenen Transplantate waren zumeist frisch oder gefrierkonserviert, in einem Fall auch gefriergetrocknet [CDC, 2002; Joyce et al., 2003]. Schließlich ist ein Bericht über eine spenderbedingte *Serratia marcescens* Infektion nach Cornea-Transplantation zu erwähnen [Levartovsky & Lazarovich, 2002].
Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Kontaminations- bzw. Infektionsrate von allogenen Knochentransplantaten mit nicht-viralen Erregern ein Risiko darstellt. Trotz umfangreicher Sicherheitsmaßnahmen bei der Explantation, Bearbeitung und Transplantation (aspetische Bedingungen, mikrobiologisches Monitoring) ist die Integration eines Inaktivierungsverfahrens in den Herstellungsprozess sinnvoll. Hierfür sprechen die zwar quantitativ wenigen, aber teils dramatischen klinischen Verläufe transplantat-assoziierter Infektionen. Es ist jedoch abzuwägen, inwieweit solche Verfahren in der Lage sind sämtliche Bereiche des Transplantates zu erreichen und die biologischen Eigenschaften des Gewebes negativ beeinflussen.

## 2.2 Virusauswahl für Validierungsstudien

Die Testviren für die vorliegenden Untersuchungen wurden entsprechend bestehender Normen und Richtlinien ausgewählt und repräsentieren ein Spektrum der klinisch relevantesten Viren.
Das Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) sowie das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) [BfArM/PEI 1994] fordern für Validierungsverfahren zur Inaktivierung von Viren die Verwendung von

- Humanem Immundefizienzvirus (z.B. HIV-2),

- einem Modellvirus für das Hepatitis C-Virus (z.B. Bovines Virus Diarrhoe Virus, BVDV),
- einem umhüllten DNA-Virus (z.B. Pseudorabies-Virus, ca. 150 nm, ein Analogon des humanen Herpesvirus 3, syn. Varicella-Zoster-Virus) und
- einem nicht-umhüllten Virus (z.B. Hepatitis A-Virus).

Diese Viren wurden in die Untersuchungen einbezogen und durch das Poliomyelitis-Virus Typ 1 (Familie der Picornaviridae, Genus Enterovirus, ca. 30 nm, einzelsträngiges nicht-umhülltes RNA-Virus), als Standard-Testvirus in Desinfektionsmittelprüfungen, sowie das nicht-umhüllte, 20 nm große Bovine Parvovirus (BPV, im Peressigsäure-Versuch Porcines Parvovirus, PPV, als Modellvirus für das humane Parvovirus B19) ergänzt. BPV war Ziel zahlreicher Untersuchungen hinsichtlich der Resistenz gegen physikalische bzw. chemische Einwirkungen [Mahnel, 1979; Bräuniger et al., 2000]. Es wird seit längerem als hoch resistentes Testvirus bei der Prüfung der Validität bzw. Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsverfahren eingesetzt. BPV kann auch als allgemeines Modellvirus für vergleichbare thermostabile Viren dienen. Hierzu gehört u.a. das Hepatitis B-Virus, welches eine mittlere, gegenüber Parvoviren jedoch geringere Hitzeresistenz besitzt [Wallhäußer, 1995].

## 2.3 Auswahl nicht-viraler Erreger für die Validierungsstudien

Die für die Versuche der vorliegenden Untersuchungen verwendeten Mikroorganismen wurden entsprechend bestehender Normen und Empfehlungen sowie den klinisch relevanten Daten zu gefundenen Kontaminations- und Infektionskeimen zusammengestellt:

- *Staphylococcus aureus* (koagulasepositive grampositive Haufenkokken, fakultativ anaerob; Krankheitsbilder: Lokalinfektion, Sepsis, Endokarditis, toxinbedingte Syndrome),
- *Staphylococcus epidermidis* (koagulasenegative grampositive Haufenkokken, fakultativ anaerob; Krankheitsbilder: Endoplastitis, Sepsis, Peritonitis)
- *Enterococcus faecium* (grampositive Kettenkokken, fakultativ anaerob; Krankheitsbilder: Sepsis, Endokarditis, Harnwegsinfektionen, Peritonitis, Weichteil- und Wundinfektionen),
- *Pseudomonas aeruginosa* (gramnegative Stäbchen, obligat aerob; Krankheitsbilder: nosokomiale Infektionen, Pneumonie, Endokarditis, Meningitis, Otitis externa, Keratitis, Wund-, Harnwegs- und Hautinfektionen),
- *Clostridium sporogenes* (grampositive Stäbchen, obligat anaerob, sporenbildend; Krankheitsbilder: *C perfringens:* Gasbrand, *C. tetani*: Tetanus, *C. botulinum*: Botulismus, *C. sordelli*: Sepsis),
- *Bacillus subtilis* und seine Sporen (grampositive Stäbchen, fakultativ anaerob, sporenbildend; Krankheitsbilder: Lebensmittelvergiftung, Kathetersepsis, *B. anthrax*: Milzbrand, *B. cereus*: Pneumonie, Endokarditis, Endophtalmitis, Lebensmittelvergiftung)

- *Mycobacterium terrae* als Modellkeim für *Mycobacterium tuberculosis* (schwach grampositive, obligat aerobe Stäbchen, säurefest; Krankheitsbild: Tuberkulose)
- Sporen (Konidien) von *Aspergillus niger* (fakultativ pathogener, aerob und anaerob wachsender Fadenpilz, Krankheitsbilder: Aspergillose)
- *Candida albicans* (fakultativ pathogener, aerob und fakultativ anaerob wachsender Sprosspilz, Krankheitsbilder: allg.: Haut- und Schleimhautinfektionen, z.B. Mundsoor, Intertrigo, Vulvovaginits, Endokarditis, Harnwegsinfektionen, katheterassoziierte Infektionen, Sepsis)

## 3. Labordiagnostische Maßnahmen zur Erhöhung der viralen Transplantatsicherheit

Gemäß den einschlägigen Richtlinien und Empfehlungen zur allogenen Knochentransplantation (siehe 1.1) sowie den Vorgaben des BfArM im Rahmen der Arzneimittelzulassung von Gewebetransplantaten sind als Mindestanforderungen an die labormedizinische Diagnostik des Gewebespenders folgende Parameter zu bestimmen: Antikörper gegen HIV-1/2, Antikörper gegen HCV, Antikörper gegen das Core-Protein des HBV (anti-HBc), HBsAg, Antikörper gegen Treponema pallidum (TPHA), ALAT (nur bei Lebendspendern). Hämodilutionseffekte durch vorhergehende Infusionen bzw. Transfusionen sind wegen möglicherweise falsch-negativer Ergebnisse zu beachteten [EATB/EAMST, 1997]. Auch die Möglichkeit falsch positiver Resultate (z.B. Anti-HBc nach Immunglobulingaben bzw. Transfusionen) muss in die Bewertung der Befunde einbezogen werden.

In Anbetracht der eingeschränkten Möglichkeiten, eine umfassende Anamnese bzw. klinische Untersuchungen durchzuführen und damit gezielt Gewebespender mit niedrigem Risiko für parenterale Infektionen zu selektieren, müssen bei Multiorgan- bzw. Leichenspendern zusätzlich Untersuchungen zum Nachweis von HIV-, HBV-, und HCV-Genom mittels geeigneter Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT, z.B. polymerase chain reaction, PCR) durchgeführt werden. Durch NAT-Untersuchungen wird das ´diagnostische Fenster´ bis zu einem positiven Antikörper- bzw. Antigentest deutlich reduziert (siehe Tabelle 2). Wegen des grundsätzlich ´elektiven´ Charakters der Knochentransplantation ist auch bei den NAT-Testungen eine <u>größtmögliche Sicherheit</u> zu fordern. Hierzu gehört, die Gewebespender-NAT-Untersuchung ausschließlich an der <u>Einzelspenderprobe</u> durchzuführen und nicht an Pools aus zahlreichen Spenden, wie dies im Blutspendewesen üblich ist. In einem mathematischen Modell [Weusten et al., 2002] führt die Testung an der Einzelspende anstelle der Testung an einem 96er Pool zu folgender Verringerung des Risikos einer Virusübertragung/10 Millionen Erythrozytenkonzentrat-Transfusionen: HIV: 0.47-0.62 auf 0.010-0.045; HBV: 11-13 auf 3.3-5.1; HCV: 1.7-2.0 auf 0.5-0.8.

Tabelle 2. Serokonversionen und diagnostische Fenster: Anti-HIV, Anti-HCV und HBsAg [Müller-Breitkreuz, 2000; Busch 2003]

| | Anti-HIV | Anti-HCV | HBsAg |
|---|---|---|---|
| Serokonversionen (in 4,8 Millionen Blutspendern/1997) | 23 | 49 | 37 |
| Diagnostisches Fenster Serologie (Tage) | 22 (6-38) | 66 (38-94) | 56 (25-109) |
| Wahrscheinlichkeit einer ´Fensterphasen´-Spende / $10^7$Spenden | 4,3 | 16 | 25 |
| Diagnostisches Fenster NAT-Testung (Tage) | 8-10 | 6-9 | 30-66 |

Untersuchungen zur Frage der infektiösen Dosis zeigten, dass bereits geringste Virusmengen ausreichen, um eine Infektion zu erzeugen. So wird die 50%-Infektionsrate für HBV und HCV mit 10 (1-100) viralen Genomäquivalenten (geq) und für HIV mit 1.000 (100-10.000) viralen Genomäquivalenten angegeben [Weusten et al., 2002].

Um die Wertigkeit der NAT-Untersuchungen, insbesondere in Anbetracht von Virusvaliderungsstudien, einzustufen, müssen die aktuellen Nachweisgrenzen (´detection limits´) der Einzel-NAT für HIV, HCV, HBV und für das jeweils untersuchte Material definiert werden. Einen Vergleich der derzeit verwendeten NAT-Techniken und deren Nachweisgrenzen hinsichtlich der drei relevanten Viren zeigt Tabelle 3. In-house-NAT sind teilweise deutlich weniger empfindlich (´detection limit´, z.B. nur 600 Genomäquivalente (geq)/ml). Neben den für die individuelle NAT-Nachweisgrenze relevanten Kriterien der jeweiligen Extraktion, reversen Transkriptase und Transkription, stellt insbesondere das eingesetzte Probenvolumen eine absolute Limitierung der PCR dar, da im getesteten Material mindestens 1 geq vorhanden sein muss, um ein positives PCR-Ergebnis zu erhalten. Insofern wird eine sehr hohe Sensitivität letztlich nur mit höheren Probenvolumina erwirkt. Schließlich sollte in der Validierung beachtet werden, dass die PCR auch die Breite der jeweils bekannten Virusgenotypen mit annähernd gleicher Sensitivität nachweisen kann. Erste Ergebnisse der Validierung von postmortal gewonnenem Blut für die NAT liegen bereits vor. Eine grundsätzliche Eignung dieses Probenmaterials ist gegeben, jedoch müssen Inhibitionseffekte beachtet werden [Anderson et al., 2003; Strong, 2003].

Dass auch bei negativem HCV-PCR-Ergebnis keine absolute Infektionssicherheit besteht, zeigt ein vor kurzem publizierter Fall einer HCV-Übertragung durch ein Thrombozytenkonzentrat [Schüttler et al., 2000].

Tabelle 3. Sensitivitäten von NAT-Assays (geq/ml) für HIV-, HBV- und HCV-Genomnachweise [Lelie et al., 2002; Weusten et al., 2002; Tomono, 2002]

| Virus | Assay | 50% detection limit | 95% detection limit |
|---|---|---|---|
| HIV | AmpliScreen 1.5* | 7.1 (4.7-10.7) | 126 (67-311) |
| RNA genotyp B | Gen-Probe TMA# | 3.6 (2.6-5.0) | 31 (20-52) |
| | NucliSens-AmpliScreen 1.5§ | 4.6 (3.2-6.7) | 37 (23-69) |
| | Cobas AmpliScreen 1.5 | 6.6 (4.4-10.1) | 92 (49-238) |
| HCV | AmpliScreen 2.0* | 14 (11-19) | 126 (83-225) |
| RNA genotyp 1 | Gen-Probe TMA# | 7.9 (6.3-9.9) | 85 (64-118) |
| | NucliSens-AmpliScreen 2.0§ | 4.3 (3.1-5.9) | 21 (13-44) |
| | Quiagen-HCV-Amplicor 2.0 | 18 (10-32) | 144 (74-402) |
| HBV** | AmpliScreen 2.0* | 14 | 126 |
| | Gen-Probe TMA# | 7.9 | 85 |
| | NucliSens-AmpliScreen 2.0§ | 4.3 | 21 |

*Roche, Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA, #Gen-Probe, San Diego, CA, USA, §Roche-Kit kombiniert mit Extractor-Kit von bioMérieux, **Vorläufige Daten weisen auf eine Vergleichbarkeit zur HCV-PCR-Technik hin. Die In-house-PCR des Institutes für Virologie der Charité besitzt für HBV ein ´detection limit´ von 268 geq/ml.

Durch die infektionsserologischen bzw. molekulargenetischen Untersuchungen auf HIV, HBV und HCV ist die Menge der ggf. nicht erfassten Viren in potenziell infektiösen Spendergeweben bereits deutlich nach oben begrenzt worden. Der Anspruch an Virusinaktivierungsverfahren besteht nun darin, die verbleibende Viruslast sicher zu beseitigen.

## 4. Festlegung der Zielparameter in den Validierungsuntersuchungen

### 4.1 Virusinaktivierung

Die für Virusinaktivierungsversuche zutreffende CEN-Norm ´Sterilization of medical devices utilizing tissue - Validation of the inactivation of viruses and other transmissible agents´ [CEN, 1994] fordert über die Gesamtheit aller Reduktionsschritte (Anamnese, Spenderauswahl, Infektionsserologie, präparative Schritte, Inaktivierungsschritte) eine Reduktion um mehr als 6 $\log_{10}$-Stufen. Die deutschen Vorgaben der ´Validierungsstudien zum Nachweis der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut oder Plasma´ [BfArM/PEI, 1994] betonen, dass das benutzte Verfahren mindestens einen Verfahrensschritt beinhalten muss, der eine Reduktion des Gehaltes des betreffenden Virus von $\geq 4.0 \log_{10}$ bewirkt.

Ähnliche Ausagen trifft die ´European Agency for the Evaluation of Medicinal Products´ in ihren Richtlinien "The Design, Contribution and Interpretion of Studies Validating the Inactivation

and Removal of Viruses" [EAEMP, 1996]. Generelle Anforderungen an die Höhe des Gesamtreduktionsfaktors werden hier nicht gestellt, da dieser u.a. von der theoretischen Viruslast im Ausgangsmaterial (Spenderauswahl) abhängig ist.

Unter Beachtung der unter Punkt 3. dargelegten Nachweisgrenzen der aktuellen NAT-Techniken für eine Einzelspenderprobe (20-600 geq/ml) kann postuliert werden, dass ein Virusinaktivierungsverfahren, welches eine Reduktion der Infektiösität (worst case: 1 geq = 1 infektiöses Virus) um mindestens **4 $\log_{10}$-Stufen ($TCID_{50}$ (tissue culture infectious dose 50)/ml)** erreicht, ausreichende Sicherheit hinsichtlich einer HIV-, HBV- und HCV-Übertragung durch allogene Knochentransplantate bietet, wenn der zuvor mittels validierter Verfahren durchgeführte Virusgenomnachweis aus der Einzelspenderprobe negativ ist.

## 4.2 Inaktivierung nicht-viraler Mikroorganismen

Die Vorgaben leiten sich aus den Normen und Richtlinien zur Desinfektionsmittelprüfung bzw. zur Sterilisation von Medizinprodukten ab, die in Tabelle 4 dargestellt sind.

Demnach wurde für die Validierungsuntersuchungen festgelegt, dass ein Inaktivierungsverfahren als ´hinreichend´ eingestuft wird, welches eine Reduktion der Lebendkeimzahl der getesteten Mikroorganismen in allogenen Knochentransplantaten um mindestens **5 $\log_{10}$ cfu (colony forming units)/ml** erzielt.

Tabelle 4. Übersicht der relevanten Normen für die Validierung von Desinfektions- bzw. Sterilisationsverfahren

| Norm | Titel | Relevante Passagen |
|---|---|---|
| EN 1040 [1997-04] | Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika, Bakterizide Wirkung (Basistest) | -Prüfkeime (*S. aureus, P. aeruginosa*)<br>-Neutralisationsmedien<br>-Verminderung der Lebendkeimzahl: um Faktor ≥ $10^5$ logarithmisch |
| pr EN 13624* [1999-06] | Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel für Instrumente im humanmedizinischen Bereich | -Prüfkeime (*C. albicans, A. niger*)<br>-Neutralisationsmedien<br>-Verminderung der Lebendkeimzahl: um Faktor ≥ $10^5$ logarithmisch |
| EN ISO 14160 [1998-06] | Sterilisation von Medizinprodukten für den einmaligen Gebrauch mit Bestandteilen tierischer Herkunft | -Prüfkeime, Medien, Bebrütungsbedingungen<br>-Auswirkungen organischer Materialien<br>-Test auf Sporeninaktivierung |
| pr ISO/DIS 14937* [1999-08] | Sterilization of health care products - General criteria for characterization of a sterilizing agent and development, validation and routine control of a sterilization process | -Prüfkeime (umfassendste Vorgabe)<br>-Neutralisationsmöglichkeiten<br>-Forderung nach "worst case"-Bedingungen<br>-In-Prozess-Kontrollen |

*vorläufige Norm

## 5. Ergebnisse - Validierung von Verfahren zur Inaktivierung von klinisch relevanten Erregern in allogenen Knochentransplantaten (Publikationen)

Die vorliegende Habilitationsschrift umfasst Untersuchungen zur Wirksamkeit unterschiedlicher physikalischer und chemischer Inaktivierungsverfahren, die unter Verwendung ausgewählter Viren, Bakterien, Pilze, Sporenbildner und Sporen in allogenen Knochentransplantaten durchgeführt worden sind. Die Projekte wurden getrennt nach viralen und nicht-viralen Erregern bearbeitet.

Die Ergebnisse dieser Projekte sind in fünf Originalarbeiten im Journal der ´International Association for Biological Standardisation´ (Biologicals) publiziert worden. Den einzelnen Arbeiten (5.1 – 5.3) ist jeweils eine kurze inhaltliche Zusammenfassung vorangestellt.

### 5.1. Chemische Behandlung der Knochentransplantate mit Peressigsäure/Ethanol

Seit den achtziger Jahren werden in zunehmendem Maße Ethanol und Peressigsäure für die Sterilisation von musculoskeletalen Transplantaten verwendet. Jedoch ist die Diffusion dieser Substanzen in die Gewebe eingeschränkt. Penetrationshemmende Fettschranken müssen durch Behandlung der Knochenspongiosa und anderer fetthaltiger Gewebe mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch oder einem gleichwertigen validierten Verfahren entfernt werden.

Die bakterizide, fungizide und sporizide Wirkung der Peressigsäure (PES, $CH_3CO_3H$) ist bereits seit längerem bekannt [von Versen et al., 1992; Wutzler & Sauerbrei, 2000]. Die Mehrzahl der Mikroben ist im Laufe der Evolution mit effektiven Entgiftungsenzymen ausgestattet worden, die alle beim normalen Stoffwechsel entstehenden zelltoxischen Sauerstoffderivate fast augenblicklich zerstören. Das wichtigste und wirksamste Enzym ist die eisenhaltige Katalase. Sie zersetzt pro Sekunde mindestens die 100fache Menge reinen Wasserstoffperoxids, insofern besitzen die Mikroorganismen ein regelrechtes ´Katalase-Schutzschild´. Wasserstoffperoxidmoleküle zerfallen weitgehend wirkungslos, der wirksame aktive Sauerstoff wird in harmlosen molekularen Sauerstoff umgewandelt. Katalase ist jedoch gegen PES wirkungslos. Die hervorragend lipidlöslichen PES-Moleküle durchdringen alle Zellmembranen, gelangen zu den ungeschützten, oxidationsempfindlichen Stoffwechselenzymen und spalten hier aktiven Sauerstoff ab. Bevorzugt werden Strukturelemente mit SH- oder -S-S-Gruppen oxidiert. Sie verlieren dadurch irreversibel ihre Funktion, der Zellstoffwechsel bricht zusammen.

Der Ethanolzusatz führt im Verfahrensprozess zu einer Herabsetzung der Oberflächenspannung, durch den Unterdruck (200 mbar) werden durch die Peressigsäurereaktion entstehende Gasbläschen entfernt. Die weitere Penetration des Sterilisationsmediums in das entfettete Knochengewebe wird durch die ständige Agitation der Sterilisationsgefäße gefördert. Um eine ausreichende

Diffusion der Chemikalien in das entfettete Knochengewebe zu gewährleisten, sollte die Dicke der Transplantate in einer Ebene 15 mm nicht überschreiten.
In den nachfolgend beschriebenen zwei Studien überprüften wir die Inaktivierungspotenz des Peressigsäure-Ethanol-Verfahrens an humanen Spongiosawürfeln, die mit definierten Viren, Bakterien, Pilzen, Sporenbildnern und Sporen kontaminiert wurden.

### 5.1.1 Validierung der Inaktivierung klinisch relevanter Viren bzw. deren Modellviren

Publikation

Pruss A, Kao M, Kiesewetter H, von Versen R, Pauli G (1999) **Virus Safety of Avital Bone Tisue Transplants: Evaluation of Sterilization Steps of Spongiosa Cuboids Using a Peracetic Acid-Ethanol Mixture.** Biologicals 27: 195-201.

Zusammenfassung

Die Zielstellung der Studie bestand in der Validierung der virusinaktivierenden Kapazität des Herstellungsprozesses allogener Knochenspongiosa. Sowohl der Sterilisationsschritt (Peressigsäure/Ethanol/Aqua ad iniectabilia, 2:1:1) als auch das Entfettungsverfahren (Chloroform/Methanol, 2:1) wurden in Kinetik- und Carriertests untersucht. Relevante umhüllte und nicht-umhüllte Viren sowie Modellviren, die zu unterschiedlichen Familien gehören, wurden in die Untersuchung einbezogen: HIV-2, Bovines Virus Diarrhoe Virus, Pseudorabiesvirus, HAV, Poliovirus 1 und Porcines Parvovirus. Die Ermittlung der Inaktivierung erfolgte durch die Erfassung cytopathogener Effekte (CPE) mit nachfolgender Berechnung der $TCID_{50}$/ml.
Außer beim Hepatitis A-Virus wurde durch die 4-stündige Peressigsäure/Ethanol-Behandlung bei allen Viren die gewünschte Titerreduktion von mehr als 4 $log_{10}$-Stufen ($TCID_{50}$/ml) im Virusgespikten, entfetteten Spongiosawürfel (15x15x15 mm) erreicht. Spongiöses Gewebe ist für Validierungsuntersuchungen am wichtigsten, weil für knöcherne Spongiosa (aus Epiphysen der Extremitätenknochen, der Wirbelsäule und des Os ilium) der weitaus größte klinische Bedarf besteht. Eine günstige Form der Prüfkörper (Würfel) erlaubt darüber hinaus eine standardisierte Eindringtiefe der Chemikalien. Aufgrund der etwa 200-fach höheren Oberfläche und der daraus resultierenden hohen Blutmenge von Spongiosa gegenüber Corticalis kann dieses Modell als ´worst case´ und somit auf alle knöchernen Transplantate anwendbar, angesehen werden.
Die Kinetikuntersuchungen belegten, dass der virusinaktivierende Effekt bei den meisten untersuchten Viren bereits nach 5 Minuten eintritt. Längere Inaktivierungzeiten wurden bei PPV beobachtet, HAV zeigte die größte Resistenz. Demzufolge wurde der Entfettungsschritt mit zellassoziiertem HAV untersucht. Die Reduktion des Virustiters betrug 7 $log_{10}$ Stufen.

### 5.1.2 Validierung der Inaktivierung ausgewählter klinisch relevanter Bakterien, Pilze, Sporen und Sporenbildner

Publikation

Pruss A, Baumann B, Seibold M, Kao M, Tintelnot K, von Versen R, Radtke H, Dörner T, Pauli G, Göbel UB (2001) **Validation of the Sterilization Procedure of Allogeneic Avital Bone Transplants Using Peracetic Acid-Ethanol.** Biologicals 29: 59-66.

Zusammenfassung

Nach Abschluss der Virusinaktivierungsuntersuchungen wurde in Anlehnung an vorhandene nationale und internationale Normen bzw. Normenentwürfe (u.a. EN 1040, prEN 13624, prISO/DIS 14937) die Wirksamkeit des Peressigsäure/Ethanol-Verfahrens gegen nicht-virale Mikroorganismen geprüft. Aufgrund der standardisierbaren Form sowie der klinischen Relevanz diente erneut entfettete humane Knochenspongiosa (Würfel 15 x 15 x 15 mm) als Modell.

Eine Reduktion der Lebendkeimzahl von > 5 $\log_{10}$-Stufen (cfu/ml) der eingesetzten Testkeime *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Clostridium sporogenes, Mycobacterium terrae, Candida albicans* sowie Sporen von *Bacillus subtilis* wurde bereits nach 2 Stunden Einwirkzeit erreicht. Dabei konnten in keinem der Peressigsäure-behandelten Prüfkörper lebensfähige Keime nachgewiesen werden. Auch *Aspergillus niger* wurde vollständig inaktiviert.

Insgesamt betrachtet, besitzt das Verfahren eine ausreichende Wirksamkeit gegen die getesteten Viren, Bakterien, Pilze, Sporenbildner und Sporen und erweist sich als einfache und zuverlässige Methode zur Inaktivierung von in humanen Knochen- und Weichteiltransplantaten (Schichtdicke in einer Ebene ≤ 15 mm) potenziell vorhandenen Keimen.

## 5.2 Sterilisation von Knochentransplantaten mit Gammastrahlen

Der keimzerstörende Effekt der sehr energiereichen Gamma-Bestrahlung, die beim Zerfall radioaktiver Elemente (z.B. Cobalt-60) entsteht, liegt vor allem darin, die Zellkerne resp. die genetische Information zu treffen, Defekte zu setzen und damit eine spätere Replikation des Erregers zu verhindern. Hinzu kommen zellzerstörende Sekundäreffekte wie z.B. die Bildung freier Radikale. Die Aufbringung der Bestrahlungsdosis erfolgt in vielen Einzelschritten durch mehrfaches Umfahren der Co-60-Strahlenquelle und ist nur in zugelassenen Einrichtungen möglich.

Derzeit existieren keine klaren Vorgaben zu Reduktionsfaktoren von Viren in humanen Knochengeweben. Die Bandbreite der empfohlenen Dosen reichen bis zu 89 kGy [Campbell & Li, 1999]. Große Dosis-Spannweiten wurden für eine Inaktivierung des HIV beschrieben. Diese reichen von 2,5 kGy über 25 kGy [Spire et al., 1985; Salai et al., 1997] bis hin zu Versuchen, bei denen mittels NAT das HIV-1 Genom als Nachweis einer Inaktivierung herangezogen wurde. Hier waren Gamma-Bestrahlungen mit einer Dosis von 30-40 kGy notwendig, bis die HIV-1-Sequenzen nicht mehr amplifizierbar waren [Fideler et al., 1994]. Andere Arbeitsgruppen untersuchten den $D_{10}$-Wert (erforderliche Strahlendosis, um den Anfangsvirustiter um 90% bzw. 1 $\log_{10}$-Stufe zu reduzieren) in Abhängigkeit von der Temperatur. Der $D_{10}$-Wert für HIV-1 lag im Bereich von 7,2 kGy bei Raumtemperatur und 8,3 kGy bei -80°C [Hernigou et al., 2000]. Dies würde bedeuten, dass für eine Reduktion der Virusinfektiosität um 4 $\log_{10}$-Stufen 28,8 kGy (RT) bzw. 33,2 kGy (-80°C) erforderlich wären. Diese Ergebnisse korrelieren mit meinen nachfolgend dargestellten Untersuchungen, in denen ein $D_{10}$-Wert für HIV von 7,1 kGy bei –30°C, d.h. 28,4 kGy für 4 $\log_{10}$-Stufen, ermittelt wurde.

Bis zu einer Bestrahlungsdosis von 15 kGy werden keine, bis zu einer Dosis von 25 kGy nur geringe biomechanische Veränderungen an den Knochentransplantaten beobachtet. Bestrahlungsdosen oberhalb von 30 kGy führen zu signifikanten Veränderungen [Tomford, 2003]. Neue Verfahren, bei denen eine Protektion der Knochenproteine mittels Ascorbinsäure-haltigen Substanzen nachgewiesen wurde, erlauben den Einsatz von Bestrahlungsdosen bis zu 50 kGy [Grieb et al., 2002; Amareld et al., 2003]. Diese Dosen würden zu völliger Keimfreiheit und höchstem Sicherheitsstandard führen. Bestätigende Experimente an Knochentransplantaten stehen jedoch noch aus.

Die im wesentlichen die Reduktion von Bakterien, Pilzen und Sporen betreffenden Richtlinien und Empfehlungen zur ´Industriellen Sterilisation von Medizinprodukten´ [IAEA, 1990] fordern eine Gesamtreduktion um 6 $\log_{10}$-Stufen bzw. das Erreichen eines ´sterility assurance level´ (SAL, Wahrscheinlichkeit eines lebenden Mikroorganismus nach Abschluss der Sterilisationsmaßnahmen) von $10^{-6}$. Der SAL ist für die Bewertung von humanen Ausgangsmaterialien jedoch eher ungeeignet, da die geforderten Standardisierungen und Versuchsbedingungen für Medizinproduk-

te bei Transplantaten humanen Ursprungs zumeist nicht gewährleistet werden können bzw. andere Maßstäbe gelten. Die International Atomic Energy Association (IAEA) empfiehlt eine Standarddosis von 25 kGy [IAEA, 2002], welche derzeit in den meisten Gewebebanken, die einen Gamma-Bestrahlungsprozess in die Herstellung integriert haben, verwendet wird. In den USA wird Knochengewebe teilweise mit 15 kGy bestrahlt. Diese Maßnahme dient jedoch im wesentlichen der Reduktion des mikrobiologischen Bioburdens und nicht der Virusinaktivierung.
Die Angabe des $D_{10}$-Wertes muss für Virusinaktivierungsstudien aus Vergleichbarkeitsgründen als Standard gefordert werden.
Definitive Aussagen zur Effizienz des Verfahrens bei der Sterilisation kontaminierter Knochengewebe lagen bisher nicht vor.

### 5.2.1 Validierung der Inaktivierung klinisch relevanter Viren bzw. deren Modellviren

Publikation

Pruss A, Kao M, Gohs U, Koscielny J, von Versen R, Pauli G (2002) **Effect of Gamma Irradiation on Human Cortical Bone Transplants Contaminated with Enveloped and Non-enveloped Viruses.** Biologicals 30: 125-133.

Zusammenfassung

Gammastrahlen sind in der Lage, biologische Strukturen durch primäre (Beschädigung des Genoms, Membranschäden) und sekundäre Effekte (Radikalbildung) zu zerstören. Auch Viren verlieren, in Abhängigkeit von der eingesetzten Bestrahlungsdosis ihre Infektiösität.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei einer Temperatur von -30 ± 5°C der virusinaktivierende Effekt von Gammabestrahlung (Co-60-Quelle) untersucht. Das eingesetzte Virusspektrum entsprach den unter 5.1.1 eingesetzten Spezies. Das Porcine Parvovirus (PPV) wurde dabei durch das Bovine Parvovirus (BPV) ersetzt. Die Untersuchungen umfassten Kinetikstudien zur Berechnung des $D_{10}$-Wertes sowie Experimente mit Virus-kontaminierten Femurdiaphysen.

Folgende $D_{10}$-Werte wurden ermittelt: BPV 7,3 kGy, HIV-2 7,1 kGy, PV-1 7,1 kGy, HAV 5,3 kGy, PRV 5,3 kGy, BVDV <3,0 kGy. Anschließend wurden anhand dieser Werte die Effekte der Virusinaktivierung in kontaminierten Corticalistransplantaten überprüft. Für BPV, das resistenteste untersuchte Virus, wurde eine Dosis von 34 kGy empfohlen, um eine sichere 4 $\log_{10}$-Abreicherung ($TCID_{50}$/ml) zu erreichen.

### 5.2.2 Gammastrahlensensibilität von nicht-viralen Mikroorganismen

Bekannte $D_{10}$-Werte für verschiedene Bakterien, Sporenbildner und Pilze sind in Tabelle 5 aufgeführt. Unter Beachtung der in Punkt 5.2.1 dargestellten $D_{10}$-Werte für Viren wird leicht erkennbar, dass nicht-virale Mikroorganismen weitaus strahlensensibler sind. Dies liegt vor allem an der unterschiedlichen Genomgröße bzw. dem Zelldurchmesser (Bakterien ca. 1-5 µm, Pilze und Sporen < 10 µm), welcher den von infektiösen Viren (20-150 nm) bei weitem übersteigt. Dadurch können die Gammastrahlen diese Erreger pro Zeiteinheit weitaus häufiger treffen und somit bereits bei niedrigen Dosen zellzerstörende Effekte hervorrufen.

Tabelle 5. $D_{10}$-Werte für ausgewählte nicht-virale Mikroorganismen [Saleh et al., 1988; Clavero et al., 1994; Wallhäußer, 1995; Rajkowski et al., 2003]

| Mikroorganismus | $D_{10}$-Wert (kGy) |
|---|---|
| *Escherichia coli* | 0.31 |
| *Enterobacter* spp. | 0.31 |
| *Salmonella* spp. | 1.10 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 0.16 |
| *Staphylococcus aureus* | 0.20 |
| *Streptococcus faecium* | 2.80 |
| *Campylobacter jejuni* | 0.23 |
| *Bacillus subtilis* | 0.60 |
| *Clostridium sporogenes* | 1.60 |
| *Candida crusei* | 1.16 |
| *Aspergillus niger* | 0.04 |

Geht man davon aus, dass die für eine Gammabestrahlung von Knochentransplantaten eingesetzte Dosis auch in hinreichender Form (4 $\log_{10}$) viruzid wirken soll, müssen Dosen von 25-35 kGy gewählt werden. Diese Bestrahlungsdosen würden bei Bakterien, Pilzen und Sporen zu einer Reduktion um mehr als 10 $\log_{10}$-Stufen führen. Insofern ist eine Validierung des Verfahrens hinsichtlich der inaktivierenden Potenz der Gammabestrahlung nicht-viraler Mikroorganismen in allogenen Knochentransplantaten nicht indiziert [Pruss, 2004].

Hinzu kommt, dass bereits eine Vielzahl von Untersuchungen zu dieser Thematik vorliegen [Hilmy et al, 2000] und erst vor kurzem der ´Code of Practice for the Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control´ der IAEA publiziert wurde [IAEA, 2002]. Dieser beschreibt sehr umfassend die Vorgehensweise zur Festlegung eines validierten Bestrahlungsprozesses für Gewebetransplantate. Neben logistischen Abläufen werden

insbesondere die Anforderungen an die bestrahlende Einrichtung sowie die zuliefernde Gewebebank definiert. Schwerpunkt der Richtlinie bildet danach die Festlegung der Validierungskriterien des Sterilisations-/Bestrahlungsprozesses. Besonders nutzbringend sind die im Annex C der Richtlinie angefügten Tabellen zur Dosisfindung in Abhängigkeit vom ermittelten Bioburden.
Zusammenfassend wird dort nachgewiesen, dass bei einer normalen Keimverteilung und einem vorhergehenden Prozessing der Gewebe eine Dosis von 24,8 (25) kGy hinreichend sein dürfte, eine Keimbelastung von 1000 cfu/allograft zu inaktivieren.
Hauptproblem der Richtlinie ist der Umstand, dass eine virale Kontamination der Transplantate nur durch serologische Tests/Anamnese ausgeschlossen wird. Die Ermittlung eines etwaigen viralen Bioburdens ist technisch ausgesprochen schwierig. Insofern sollte die Richtlinie zumindest auf das bestehende Risiko einer Virusübertragung durch mit 25 kGy bestrahlte Gewebetransplantate hinweisen. Als Lösung des ´viralen Problems´ wären folglich entweder eine Erhöhung der Bestrahlungsdosis, die jedoch u.U. die biologische Qualität des Gewebes beeinträchtigen könnte, oder die Einführung einer triple-PCR (HIV-, HBV-, HCV-NAT) aus Serum/Plasma vom Einzelspender, deren negatives Ergebnis eine geringe theoretische Viruslast von unter 1.000 geq/ml postulieren würde, die mit 25 kGy sicher inaktiviert werden kann. Ein entsprechendes Diskussionspapier wurde durch mich bereits an die zuständigen Gremien der IAEA gesandt.

### 5.3. Thermische Behandlung mit feuchter Hitze (Marburger Knochenbanksystem)

Die in Deutschland weit verbreitete thermische Behandlung von allogenen Knochentransplantaten durch das als Marburger Knochenbanksystem bekannte ´Lobator-sd-2-System´ (270 anwendende Kliniken) umfasst derzeit nur die Desinfektion von Femurköpfen, die im Rahmen von Totalendoprothesen-Operationen des Hüftgelenks aseptisch entnommen wurden [Knaepler et al., 1994].
Die thermophysikalische Desinfektion beruht auf der Konformitätsänderung von Proteinen. Die Thermolabilität einer Vielzahl von Mikroorganismen ist ein Hauptgrund der Wahl des thermischen Desinfektionsystems, welches mit einer wirksamen Inaktivierungstemperatur von ≥82,5°C für mindestens 15 Minuten arbeitet. Das System ist in der Lage, zahlreiche Bakterien und virale Infektionserrreger ohne Beeinträchtigung der Osteokonduktivität sowie der Festigkeit und Struktur des Knochen zu eliminieren [von Garrel et al, 1997]. Letztere werden bei den Verfahren der Autoklavierung bei mehr als $100^0$C deutlich beeinträchtigt [Kuner et al., 1998].
Zielstellung der folgenden Untersuchungen war die Validierung der inaktivierenden Wirkung des „Lobator sd-2"-Systems in mit ausgewählten Mikroorganismen kontaminierten entknorpelten humanen Femurköpfen (Querdurchmesser ≤ 55 ±1 mm). Für die Prüfung des thermischen Inaktivierungsverfahrens wurde ein Femurkopfmodell verwendet, das den direkten Kontakt zwischen

Erreger und Knochen garantiert und somit einerseits eine praxisnahe Simulation von in-vivo-Bedingungen erzeugt und andererseits den Temperaturverlauf bei der ´normalen´ Thermodesinfektion im nativen Femurkopf berücksichtigt. Während erwartet wurde, dass die in die Validierung einbezogenen Viren eine hinreichende Reduktion aufzeigen, blieb zu klären, in welchem Umfang das Lobator-System thermoresistente Erreger (Sporenbildner, Sporen) inaktivieren würde.

### 5.3.1 Validierung der Inaktivierung klinisch relevanter Viren bzw. deren Modellviren

Publikation

Pruss A, Kao M, von Garrel T, Frommelt L, Gürtler L, Benedix F, Pauli G (2003) **Virus inactivation in bone tissue transplants (femoral heads) by moist heat with the ´Marburg bone bank system´** Biologicals 31: 75-82.

Zusammenfassung

Wie bereits in den vorhergehenden Untersuchungen zur virusinaktivierenden Wirkung des Peressigsäure/Ethanol-Verfahrens bzw. der Gammabestrahlung wurden die bekannten behüllten bzw. nicht-umhüllten Viren (HIV-2, BVDV, PRV, PV-1, HAV, BPV) eingesetzt.

Besonders anspruchsvoll gestaltete sich in der vorliegenden Arbeit die Erstellung des Versuchsmodells. Schließlich wurde der zentrale Zylinder eines entknorpelten Femurkopfes (Durchmesser 55 ± 1 mm) mit zellfreier Virussupension kontaminiert und direkt in ein Polypropylenröhrchen eingebracht, welches wiederum im Femurkopfbohrkanal platziert wurde. Vorhergehende Temperaturmessungen garantierten einen gegenüber dem nativen Femurkopf vergleichbaren Temperaturverlauf.

Als Einwirkzeit wurden gemäß den Vorversuchen des Herstellers und der Marburger Arbeitsgruppe um von Garrel und Knaepler mindestens 82,5°C über mindestes 15 Minuten definiert. Diese Einwirkung feuchter Hitze erbrachte in allen getesteten Viren eine Virusreduktion von ≥ 4 $\log_{10}$ ($TCID_{50}$/ml). Infektiöses Virus konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das „Lobator-sd-2"-System einen hohen Grad an Virussicherheit bei der Behandlung allogener Femurkopftransplantate garantiert.

### 5.3.2. Validierung der Inaktivierung ausgewählter Bakterien, Pilze, Sporen und Sporenbildner

Publikation

Pruss A, Seibold M, Benedix F, Frommelt L, von Garrel T, Gürtler L, Dörffel Y, Pauli G, Göbel UB (2003) **Validation of the ´Marburg bone bank system´ for thermodesinfection of allogenic femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores.** Biologicals 31: 287-294.

Zusammenfassung

Nach Abschluss der Virusinaktivierungsuntersuchungen wurden als weiteres Projekt Inaktivierungsexperimente an ausgewählten Bakterien, Pilzen, Sporenbildnern und Sporen durchgeführt. Das Untersuchungsspektrum umfasste: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecium, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis* und seine Sporen*, Clostridium sporogenes, Mycobacterium terrae, Candida albicans* und Sporen von *Aspergillus niger.*

Auch bei diesen Versuchen fand das neu entwickelte Femurkopfmodell Verwendung, die Inaktivierungsparameter (82,5°C über mindesten 15 Minuten) blieben unverändert. Vegetative Bakterien, Pilze und Pilzsporen wurden komplett inaktiviert (Reduktionsfaktor ≥ 6 $\log_{10}$ cfu/ml). Sporen von *Bacillus subtilis* sowie *Clostridium sporogenes*, jeweils als hitzeresistent bekannt, konnten nur um 1-2 $\log_{10}$-Stufen reduziert werden. Da die Gewinnung der Femurkopftransplantate jedoch im Operationssaal unter aseptischen Bedingungen erfolgt, spielt dieser Befund für die Transplantatsicherheit nur eine untergeordnete Rolle. Für die thermische Behandlung von Geweben, die außerhalb des OP, z.B. in Pathologien, entnommen wurden, ist das Marburger System jedoch nicht zu empfehlen.

In Verbindung mit den Ergebnissen der Virusinaktivierungsstudie kann das ´Marburger Knochenbank-System´ für die Behandlung von aseptisch entnommenen allogenen Femurkopftransplantaten empfohlen werden. In Verbindung mit anamnestischen Daten des Spenders und geeigneten Laborparametern bietet es eine sehr hohe Infektionssicherheit.

## 6. Zusammenfassung mit Diskussion der Ergebnisse

Die allogene Knochentransplantation ist ein weltweit anerkanntes Verfahren zur Deckung von Defekten des Skelettsystems. Es wird eine Vielzahl verschiedener Transplantate eingesetzt, deren Spektrum von massiven Allografts (komplette Extremitätenknochen, halbe Beckenknochen) über verschieden präparierte Diaphysen bzw. Spongiosablöcke bis hin zu demineralisierten Knochengranula reicht.

Die schwerwiegendste unerwünschte Begleiterscheinung der allogenen Knochentransplantation ist die Übertragung von viralen bzw. nicht-viralen Infektionserregern. Neben der Beurteilung der Spenderanamnese sowie der ausführlichen klinischen Untersuchung bzw. Inspektion des Leichnams stellen labormedizinische Untersuchungen ein zentrales Kriterium der Transplantatsicherheit dar. Sie dienen vor allem der Erfassung viraler Infektionen und umfassen primär infektionsserologische Parameter (Anti-HIV, Anti-HCV, Anti-HBc, HBsAg, TPHA, ALAT). Bei Multiorgan- bzw. Leichenspendern werden ergänzend die Testungen auf HIV-, HBV- und HCV-Genom aus der Einzelspenderprobe mittels validierter Nukleinsäure-Amplifikationstechniken gefordert. Um das bestehende Restrisiko (u.a. Nachweisgrenzen der NAT) weiter zu vermindern und gleichzeitig eine Reduktion von im Gewebe potenziell vorhandener anderer viraler und nicht-viraler Erreger zu erreichen, sollten allogene Knochentransplantate pathogeninaktiviert werden. Die gemäß den ´Richtlinien zum Führen einer Knochenbank´ alternativ empfohlene Quarantänelagerung des Spendergewebes mit einer nachfolgenden erneuten Testung von Infektionsparametern reduziert nur das Risiko einer HIV-, HBV- bzw. HCV-Infektion.

Die derzeit in Knochenbanken verwendeten Inaktivierungsverfahren (Peressigsäure/Ethanol, Gammabestrahlung, feuchte Hitze) wurden bisher nicht unter standardisierten Bedingungen geprüft. Der Stand des Wissens bezieht sich auf wenige Publikationen sowie nicht systematisch erfasste Erfahrungswerte der einzelnen Anwender. Um einen Qualitätsstandard definieren zu können, wurde in den vorliegenden Studien geprüft, welche Inaktivierungsleistung diese Methoden hinsichtlich klinisch relevanter viraler und nicht-viraler Erreger besitzen. Das Ziel war dabei der Nachweis einer Virusabreicherung um mindestens 4 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/ml bzw. einer Keimreduktion nicht-viraler Erreger um mindestens 5 $\log_{10}$ cfu/ml.

Die zuerst geprüfte Peressigsäure/Ethanol-Behandlung (Peressigsäure 2%, Ethanol 96%, Aqua ad iniectabilia, 2:1:1, 4 Stunden, 200 mbar, Agitation) führte in den Suspensionsversuchen innerhalb kürzester Zeit zur Inaktivierung einer Reihe von Viren (Pseudorabiesvirus, Poliovirus, Bovine Virus Diarrhoe Virus). Ein Reduktionsfaktor von > 4 $\log_{10}$ wurde bereits nach 5-minütiger

Behandlung erreicht. Auch HIV-2 wurde innerhalb von 5 Minuten unter die Nachweisgrenze von ≤ 1,9 $log_{10}$ inaktiviert, jedoch ergab sich durch den niedrigen Ausgangstiter von 4,44 $log_{10}$ ein Reduktionsfaktor von nur ≥ 2,54 $log_{10}$ $TCID_{50}$/ml. Beim Porcinen Parvovirus wurde der Reduktionstiter von > 4 $log_{10}$ $TCID_{50}$/ml erst nach 4 Stunden erreicht. Die genannten Befunde konnten im Carriertest (kontaminierte Spongiosawürfel als ´worst case´) bestätigt werden. Das Hepatitis A-Virus wurde sowohl im Suspensionstest als auch im Carriertest nach 4 Stunden nur um 3,7 $log_{10}$ bzw. 2,87 $log_{10}$ abgereichert. Diese relativ hohe Resistenz von HAV gegen Peressigsäure war nicht zu erwarten. Die daraufhin durchgeführte Validierung eines vorgeschalteten Verfahrensschrittes (Chloroform/Methanol-Entfettung der Spongiosa) mit zell-assoziiertem HAV zeigte eine Reduktion des HAV-Virustiters um 7,0 $log_{10}$ in den kontaminierten Spongiosawürfeln, die durch Spüleffekte und möglicherweise auch durch eine Inaktivierung durch Chloroform erzielt wird. In den Untersuchungen mit den nicht-viralen Erregern wurden alle Testkeime vollständig und um mehr als 5 $log_{10}$-Stufen (cfu/ml) inaktiviert. Lediglich bei *Aspergillus niger* konnte, durch den niedrigen Ausgangstiter bedingt, nur eine Abreicherung um 4-5 $log_{10}$-Stufen nachgewiesen werden.

Als zweites Verfahren wurde die Gammabestrahlung geprüft. Der Parameter für die Quantifizierung der Wirkung ist der $D_{10}$-Wert. Dieser beschreibt die notwendige Bestrahlungsdosis für die Abreicherung der Pathogene um eine $log_{10}$-Stufe. Die in den Kinetikversuchen (Bestrahlungsgut: -30°C, Co-60-Quelle) ermittelten $D_{10}$-Werte (BPV 7,3 kGy, HIV-2 7,1 kGy, PV-1 7,1 kGy, HAV 5,3 kGy, PRV 5,3 kGy, BVDV <3,0 kGy) entsprachen bisherigen Literaturangaben. Die hohe Strahlenresistenz des Bovinen Parvovirus (BPV) war nicht überraschend, da es sich um ein sehr kleines nicht-umhülltes Virus handelt. Um die größtmögliche Sicherheit zu gewährleisten, wurde eine Dosis von 34 kGy für allogene Knochentransplantate empfohlen. Hierbei wurde die Größe des BPV und die stärkere Strahlenabsorption des Knochengewebes (Versuchsmodell: Femurdiaphysen) berücksichtigt. Vergleichbare Dosen werden seit Jahren erfolgreich in den Gewebebanken der Republik Polen eingesetzt, ohne dass über biomechanische Alterationen berichtet wurde.

Als drittes Verfahren wurde das Marburger Knochenbanksystem ´Lobator sd-2´ (thermische Desinfektion, wirksame Phase mindestens 82,5°C über mindestens 15 Minuten) anhand zentral kontaminierter Femurköpfe getestet. Alle Viren wurden vollständig inaktiviert und um mehr als 4 $log_{10}$-Stufen abgereichert. Für HIV-2 konnte in einem Versuch trotz vollständiger Inaktivierung unter 1,49 $log_{10}$ aufgrund eines geringen Ausgangstiters von 5,0 $log_{10}$ nur eine Abreicherung von ≥ 3,51 $log_{10}$ $TCID_{50}$/ml nachgewiesen werden. Die vegetativen Bakterien und Pilze wurden ebenfalls vollständig inaktiviert (≥ 6 $log_{10}$ im Überstand). Sporen und Sporenbildner wurden erwartungsgemäß nicht ausreichend bzw. nicht inaktiviert (Abreicherung unter 2 $log_{10}$ cfu/ml). Letzteres kann im normalen ´Lobator sd-2´-Verfahren nach eigener Erfahrung jedoch vernachlässigt

werden, da die Femurköpfe unter sterilen Bedingungen im Operationssaal gewonnen werden und der (aseptische) Herstellungsprozess eine sekundäre Sporen-Kontamination ausschließt. Schließlich sichert eine Sterilkontrolle nach Abschluss des Desinfektionsprozesses die Wirkung des Verfahrens.
In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die drei getesteten Verfahren für die untersuchten Viren eine Inaktivierung gemäß den durch die zuständigen Bundesoberbehörden (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Paul-Ehrlich-Institut) empfohlenen Vorgaben garantieren. Die Inaktivierung ist aufgrund der Ergebnisse auch dann angezeigt, wenn die vorgeschriebenen anamnestischen Befragungen und klinischen Untersuchungen/Inspektionen sowie die erforderlichen labordiagnostischen Tests auf Infektionsmarker vorgenommen worden sind. Schließlich bieten die drei Verfahren zusätzliche Sicherheit durch eine umfassende Inaktivierung nicht-viraler Erreger.

Die vorliegende Arbeit soll dem ´Tissue Banker´ wissenschaftlich gesicherte Hinweise geben, seine eigenen Herstellungsprozesse unter Berücksichtigung der Transplantatsicherheit kritisch zu prüfen. Die Vorstellung und Diskussion der Ergebnisse auf internationalen Kongressen führte unter anderem dazu, dass Studien zur Pathogeninaktivierung durch die größte Gewebebank der USA, die ´Musculoskeletal Transplant Foundation´ (Edison, New Jersey) auf der Grundlage der in dieser Schrift vorgestellten Methodik durchgeführt wurden. Die Ergebnisse zur Gammabestrahlung wurden auch in den ´IAEA-Guidelines zur Strahlensterilisation von Geweben´ berücksichtigt.

**Literatur**

Amareld Jr. RW, Wersocki M, Drohan M, Drohan WN, Burgess WH, Mann DM Forng RY (2003) Controlled gamma-irradiation mediated pathogen inactivation of human urokinase preparations with significant recovery of enzymatic activity. Biologicals 31(4): 261-264.

Anderson SM, Gocke D, Belzer SW, Gamble A, Campanella C, Bankowski MJ (2003) Detection of Hepatitis C Virus RNA in Cadaveric Serum or Plasma samples Using Nucleic Acid Amplification. Abstract S-1, 27th Annual Meeting, American Association of Tissue Banks, San Diego, CA, USA, August 23-27.

Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit (2000) Humanes Cytomegalievirus (HCMV). Stellungnahme des AK Blut, Untergruppe „Bewertung Blut-assoziierter Krankheitserreger" vom 09.05.2000, www.rki.de.

Bankowski MJ (2002) Microbiology Practices in Recovery and Testing. 26th Annual Meeting, American Association of Tissue Banks, Boston, MA, USA, August 23-27, 2002

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220: 868-71.

Bräuniger S, Peters J, Borchers U, Kao M (2000) Further studies on thermal resistance of bovine parvovirus against moist and dry heat. Int J Hyg Environ Health 203(1): 71-75.

Bundesärztekammer - Wissenschaftlicher Beirat (2001) Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. Deutsches Ärzteblatt 98(15): A1011-1016.

Bein G, Sachs U (2003) Unerwünschte Wirkungen. In: Bundesärztekammer - Wissenschaftlicher Beirat (Hrsg.) Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, pp. 259-282.

Bundesärztekammer - Wissenschaftlicher Beirat, Paul-Ehrlich-Institut (2000) Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

Bundesgesetzblatt (1998) Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln – Arzneimittelgesetz (AMG). Fassung vom 11. Dezember 1998, BGBl. I 1998: 3586.

Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) und Paul-Ehrlich-Institut (PEI) (1994) Anforderungen an Validierungsstudien zum Nachweis der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut oder Plasma. Bundesanzeiger 84: 4742-4744.

Busch MP (2003) Infectious Risks of Blood Transfusions: Known Viruses and Future Threats. 27th Annual Meeting, American Association of Tissue Banks, San Diego, CA, USA, August 23-27.

Campbell DG, Li P (1999) Sterilisation of HIV with irradiation: Relevance to infected bone allografts. Aust N Z J Surg 69: 517-521.

Caspari G, Gerlich WH (2003) Durch Blut übertragbare Infektionskrankheiten. In: Mueller-Eckhardt C, Kiefel V (Hrsg.) Transfusionsmedizin, Grundlagen - Therapie - Methodik. 3. überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 599-645.

CDC, Center for Disease Control and Prevention (1987) Creutzfeldt-Jakob disease in a patient receiving a cadaveric dura mater graft. MMWR 36(21): 324-325.

CDC, Center for Disease Control and Prevention (1988) Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. MMWR 37: 597-599.

CDC, Center for Disease Control and Prevention (1989) Creutzfeldt-Jakob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft. MMWR 38(3): 37-38.

CDC, Center for Disease Control and Prevention (2002) Update: Allograft-Associated Bacterial Infections. MMWR 51(10): 207-210.

CDC, Center for Disease Control and Prevention (2003) Hepatitis C Virus Transmission from an Antibody-Negative Organ and Tissue Donor. MMWR 52(13): 273-276.

CEN, Comité Européen de Normalisation (1994) Sterilization of medical devices utilizing tissues-validation of the inactivation of viruses and other transmissible agents. 316/WG3/N-02, Delft, Netherlands.

Clavero MR, Monk JD, Beuchat LR, Doyle MP, Brackett RE (1994) Inactivation of Escherichia coli O157:H7, salmonellae and Campylobacter jejuni in raw ground beef by gamma irradiation. Appl Environ Microbiol 60(6): 2069-2075.

Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM (1995) Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. J Bone Joint Surg Am 77(2): 214-224.

Dziedzic-Goclawska A (2003) persönliche Mitteilung.

EAEMP, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (1996) Note for guidance on virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), CPMP/BWP/268/95, London, UK.

Eastlund T (2002) Tissue Transplant-Transmitted Bacterial Infections: AATB Investigation. AATB Quality Assurance Workshop IV, New Orleans, LA, USA, November 13-14.

EATB/EAMST (1997) Common standards for musculo skeletal tissue banking. OBIG-Transplant, Vienna, Austria.

Fideler BM, Vangness T, Moore T, Li Z, Rasheed S (1994) Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. A study in frozen human bone-patellar ligament-bone grafts obtained from infected cadavera. J Bone Joint Surg Am 76(7): 1032-1035.

Forsell JH, Liesman J (2000) Analysis of potential causes of positive microbiological cultures in tissue donors. Cell and Tissue Banking 1: 111-115.

Graul A, Heiden M, Gräf K, Keller-Stanislawski (2003) Hämovigilanz in Deutschland – Berichte an das Paul-Ehrlich-Institut über Verdachtsfälle von Transfusionsreaktionen im Beobachtungszeitraum Januar 1995 bis Dezember 2002. Transfus Med Hemother 30: 232-238.

Grieb T, Forng RY, Brown R, Owolabi T, Maddox E, Mc Bain A, Drohan WN, Mann DM, Burgess WH (2002) Effective use of Gamma Irradiation for Pathogen Inactivation of Monoclonal Antibody Preparations. Biologicals 30: 207-216.

Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U (2001) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Hernigou P, Gras G, Marinello G, Dormont D (2000) Influence of irradiation on the risk of transmission of HIV in bone grafts obtained from appropriately screened donors and followed by radiation sterilization. Cell and Tissue Banking 1(4): 279-289.

Hilmy N, Febrida A, Basril A (2000) Validation of Radiation Sterilization Dose for Lyophilized Amnion and Bone Grafts Cell and Tissue Banking 1(2): 143-148.

IAEA, International Atomic Energy Agency (1990) Sterility Assurance Level. In: Guidelines for Industrial Radiation Sterilization of Disposable Medical Products (Cobalt-60 Gamma Irradiation). IAEA, TECDOC-539, Vienna, Austria.

IAEA, International Atomic Energy Agency (2002) Code of Practice for the Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control. Preliminary version, August 2002, Boston, MA, USA.

James JIP (1953) Tuberculosis transmitted by bone bank. J Bone Joint Surg Br 35: 578.

Joyce MJ, Greenwald AS, Mowe J, Kennedy J, Toohey D, Heim CS, Rosier RN, Wong D (2003) Musculoskeletal Allograft Tissue Safety. Tissue Work Group, 70th Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, New Orleans, LA, USA, February 5-9.

Knaepler H, von Garrel T, Gotzen L (1994) Untersuchungen zur Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate. Hefte Z Unfallchir 235: 1-101

Knaepler H, von Garrel T, Seipp HM, Ascherl R (1992) Experimentelle Untersuchungen zur thermischen Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate und deren Auswirkungen auf die biologische Wertigkeit. Unfallchirurg 95: 477-484.

Koenigbauer UF, Eastlund T, Day JW (2000) Clinical Illness Due to Parvovirus B19 Infection after Infusion of Solvent/Detergent-Treated Pooled Plasma. Transfusion 40: 1203-1206.

Kuner EH, Schlickewei W, Huber-Lang M, Schaefer DJ, Laubenberger J (1998) Über die Verwendung autoklavierter Spongiosa. Unfallchirurg 101: 870-876.

Lelie PN, van Drimmelen HAJ, Cuypers TM, Best SJ, Stramer SL, Hyland C, Allain JP, Moncharmont P, Defer C, Nübling M, Glauser A, da Silva Cardosos M, Viret JF, Lankinen MH, Grillner L, Withmüller U, Coste J, Schottstedt V, Masecar B, Dax EM (2002) Sensitivity of HCV RNA and HIV RNA blood screening assays. Transfusion 42: 527-536.

Levartovsky S, Lazarovich A (2002) Devastating endophtalmitis caused by *Serratia marcescens* in two recipients after transplantation of corneal grafts from the same donor. Cell and Tissue Banking 3: 45-47.

Liu JW, Chao LH, Su LH, Wang JW, Wang CJ (2002) Experience with a bone bank operation and allograft bone infection in recipients at medical centre in southern Taiwan. J Hosp Infect 50: 293-297.

Lomas R, Drummond O, Kearney JN (2000) Processing of whole femoral head allografts: A method for improving clinical efficacy and safety. Cell and Tissue Banking 1: 193-200.

Lord CF, Gebhardt MC, Tomford WW, Mankin HJ (1988) Infection in Bone Allograft. Incidence, Nature, and Treatment. J Bone Joint Surg Am 70(3): 369-376.

Mahnel H (1979) Resistenzunterschiede zwischen Viren verschiedener Gruppen gegenüber einigen chemisch-physikalischen Dekontaminationsverfahren. Infection 7(5): 240-246.

Martinez O (2002) Microbiologic Screening of Cadaver Donors and Tissues for Transplantation. 26th Annual Meeting, American Association of Tissue Banks, Boston, MA, USA, August 23-27, 2002.

Matsui H, Sugimoto M, Shizuko Tsuij S, Shima M, Giddings J, Yoshioka A (1999) Transient Hypoplastic Anaemia Caused by Primary Human Parvovirus B19 Infection in a Previously Untreated Patient with Haemohilia Transfused with a Plasma-Derived, Monoclonal Antibody-Purified Factor VIII Concentrate. J Paed Haem Onc 2(1):74-76.

Meisel H, Endres AS, Walther HU, Wend UC, Gerlich WH (2003) Transmission of Hepatitis B Virus 2 Months prior to Hepatitis Surface Antigen Positivity of Donor Blood. Transfus Med Hemother 30: 228-231.

Modrow S, Falke D (1998) Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Müller-Breitkreuz K (2000) Results of viral marker screening of unpaid blood donations and probability of window period donations in 1997. Vox Sang 78: 149-157.

Nielsen HT, Larsen S, Andersen M, Ovesen O (2001) Bone bank service in Odense, Denmark. Audit of the first ten years with bone banking at the Department of Orthopaedics, Odense University Hospital. Cell and Tissue Banking 2: 179-183.

Offergeld R, Stark K, Hamouda O (2003) Infektionen bei Blutspendern. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 46: 775-779.

Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science 224: 497-500.

Pruss A, Jacker HJ, Borchert HH, Seibold M, von Versen R (2003) Peracetic Acid-Ethanol Treatment of Bone Allografts – a Reliable Sterilization Method. Abstract S-22, 27th Annual Meeting, American Association of Tissue Banks, San Diego, CA, USA, August 23-27.

Pruss A, Kao M, Gohs U, Koscielny JK, von Versen R, Pauli G (2002) Effects of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. Biologicals 30: 205-213.

Pruss A, Perka C, Degenhardt P, Maronna U, Büttner-Janz K, Paul B, Müller K, Klumpp C, Bruck JC, von Versen R (2002) Clinical Efficacy and Compatibility of Allogeneic Avital Tissue Transplants Sterilized with a Peracetic Acid/Ethanol Mixture. Cell and Tissue Banking 3(4): 235-243.

Pruss A (2004) Virus inactivation. In: Phillips GO (ed.) Proceedings of the IAEA: Expert meeting on sterilisation using ionising irradiation. Cellulon Trust, Wrexham, UK, in press.

Rajkowski KT, Boyd G, Thayer DW (2003) Irradiation D-values for Escherichia coli O157:H7 and Salmonella sp. on inoculated broccoli seeds and effects of irradiation on broccoli sprout keeping quality and seed viability. J Food Prot 66(5): 760-766.

Regel G, Südkamp NP, Illgner A, Buchenau A, Tscherne H (1992) 15 Jahre allogene Knochentransplantation. Unfallchirurg 95: 1-8.

RKI, Robert Koch Institut (2002) Prävention von HIV-Infektionen. Epidemiologisches Bulletin 48: 401-405.

Salai M, Vonsover A, Pritch M, von Versen R, Horoszowski H (1997) Human immunodeficiency virus (HIV) inactivation of banked bone by gamma irradiation. Ann Transplant 2: 55-56.

Saleh YG, Mayo MS, Ahearn DG (1988) Resistance of Some Common Fungi to Gamma Irradiation. Appl Environ Microbiol 54(8): 2134-2135.

Sanzén L, Carlsson A (1997) Transmission of human T-cell lymphotrophic virus type 1 by a deep-frozen bone allograft. Acta Orthop Scand 68(1): 72-74.

Schratt HE, Regel G, Kiesewetter B, Tscherne H (1996) HIV-Infektion durch kältekonservierte Knochentransplantate. Unfallchirurg 99: 679-684.

Schüttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems WR, Gerlich WH, Schaefer S (2000) Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. Lancet 355: 41-42.

Seifried E, Findhammer S, Roth WK (2002) Status of NAT screening for HCV, HIV and HBV – Experiences of the German Red Cross Blood Donation Services. In: Brown F, Seitz R (Hrsg.): Advances in Transfusion Safety. Dev Biol 108, Karger, Basel, pp. 23-27.

Shutkin NM (1954) Homologous-serum hepatitis following the use of refrigerated bone-bank bone. J Bone Joint Surg 36A: 160-162.

Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA, Rayfield MA, Rogers MF (1992) Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. N Engl J Med 326(11): 726-732.

Spire B, Dormont D, Barre-Sinoussi F, Montagnier L, Cherman JC (1985) Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by heat, gamma rays, and ultraviolet light. Lancet 1 (8422): 188-189.

Strong DM (2003) NAT for Cadaveric Donors. 27th Annual Meeting, American Association of Tissue Banks, San Diego, CA, USA, August 23-27.

Sutherland AG, Raafat A, Yates P, Hutchison JD (1997) Infection associated with the use of allograft bone from the North East Scotland Bone Bank. J Hosp Infect 35(3): 215-222.

Tomford WW, Starkweather RJ, Goldman MH (1981) A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. J Bone Joint Surg Am 63(2): 244-248.

Tomford WW, Thongphasuk J, Mankin HJ, Ferraro MJ (1990) Frozen musculoskeletal allografts. A study of the clinical incidence and causes of infection associated with their use. J Bone Joint Surg Am 72(8): 1137-1143.

Tomford WW (1995) Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. J Bone Joint Surg Am 77(11):1742-1754.

Tomford WW (2003) Clinical experience of radiation effects with structural and non-structural grafts. IAEA International High Level Expert Meeting ´Sterilization of Tissues using Ionising Radiations´ Wrexham, Wales UK, September 1-5.

Tomono T (2002) Status of NAT Screening for HCV, HIV and HBV: Experience in Japan. In: Advances in Transfusion Safety . Brown F, Seitz R (eds.) Dev Biol, Basel, Karger, 108: 29-39.
Urist MR, Strates BS (1971) Bone morphogenetic proteins. J Dent Res 50(6): 1392-1406.

von Garrel T (2003) Persönliche Mitteilung auf der Grundlage einer Befragung von 1.400 chirurgischen/orthopädischen Kliniken in Deutschland aus dem Jahr 2001.

von Versen R, Heider H, Kleemann I, Starke R (1992) Chemische Sterilisation biologischer Implantate mit einer Kombinationsmethode. In: Pesch HJ, Stöß H, Kummer B (Hrsg.) Osteologie aktuell, Springer-Verlag, 7(suppl.): 380–386.

Wallhäußer KH (1995) Praxis der Sterilisation - Desinfektion - Konservierung - Keimidentifizierung - Betriebshygiene. 5. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Weusten JJAM, van Drimmelen HAJ, Lelie PN (2002) Mathematic modeling of the risk for HBV, HCV, and HIV transmission by window-phase donations not detected by NAT. Transfusion 42: 537-548.

WHO, World Health Organization – Health Technology and Pharmazeutical Cluster (2003) Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products. WHO/BCT/QSD/03.01. Geneva, Switzerland.

Wippermann BW, Schratt HE, Steeg S, Tscherne H (1997) Complications of spongiosa harvesting of the ilial crest. A retrospective analysis of 1,191 cases. Chirurg 68(12): 1286-1291.

Wutzler P, Sauerbrei A (2000) Virucidal efficacy of a combination of 0.2% peracetic acid and 80% (v/v) ethanol (PAA-ethanol) as a potential hand disinfectant. J Hosp Infect 46: 304-308.

**Abkürzungsverzeichnis**

| | |
|---|---|
| AIDS | acquired immune deficiency syndrome |
| ALAT | Alaninaminotransferase |
| AMG | Arzneimittelgesetz |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BÄK | Bundesärztekammer |
| BfArM | Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte |
| BMG | Bundesministerium für Gesundheit |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| BPV | Bovines Parvovirus |
| BVDV | Bovines Virus Diarrhoe Virus |
| BWP | Biotechnology Working Party |
| CDC | Center for Disease Control and Prevention |
| CEN | Comité Européen de Normalisation |
| cfu | colony forming units |
| CJD | Creutzfeldt Jakob disease |
| CLB | Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service |
| CPE | cytopathischer Effekt |
| CPMP | Committee for proprietary medicinal products |
| DIN | Deutsches Institut für Normung e.V. |
| DIS | Draft International Standard |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| D-Wert | Dezimalreduktionswert |
| EATB | European Association of Tissue Banks |
| EAMST | European Association of Musculo-Skeletal Transplantation |
| EN | Europäische Norm |
| geq | Genomäquivalent |
| GMP | good manufacturing practice |
| HAV | Hepatitis A-Virus |
| HBc | Hepatitis B-core (Antigen) |
| HBsAg | Hepatitis B-surface-Antigen |
| HBV | Hepatitis B-Virus |
| HCV | Hepatitis C-Virus |
| HIV | Humanes Immundefizienz Virus |

| | |
|---|---|
| HTLV | Humanes T-Zell-Leukämie-Virus |
| ISO | International Organization for Standardization |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PEI | Paul-Ehrlich-Institut |
| pH | pondus hydrogenii |
| PPV | Porcines Parvovirus |
| pr EN | Europäischer Normentwurf |
| PRV | Pseudorabies-Virus |
| PV | Poliomyelitis-Virus |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| RNA | ribonucleic acid |
| RPMI | Roosevelt Park Memorial Institute |
| RT | Raumtemperatur |
| syn. | synonym |
| TCID | tissue culture infectious dose |
| TEP | Totalendoprothese |

**Liste der 5 Publikationen für die kumulative Habilitationsschrift**

Pruss A, Kao M, Kiesewetter H, von Versen R, Pauli G (1999) Virus Safety of Avital Bone Tisue Transplants: Evaluation of Sterilization Steps of Spongiosa Cuboids Using a Peracetic Acid-Ethanol Mixture. Biologicals 27: 195-201.

Pruss A, Baumann B, Seibold M, Kao M, Tintelnot K, von Versen R, Radtke H, Dörner T, Pauli G, Göbel UB (2001) Validation of the Sterilization Procedure of Allogeneic Avital Bone Transplants Using Peracetic Acid-Ethanol. Biologicals 29: 59-66.

Pruss A, Kao M, Gohs U, Koscielny J, von Versen R, Pauli G (2002) Effect of Gamma Irradiation on Human Cortical Bone Transplants Contaminated with Enveloped and Non-enveloped Viruses. Biologicals 30: 125-133.

Pruss A, Kao M, von Garrel T, Frommelt L, Gürtler L, Benedix F, Pauli G (2003) Virus inactivation in bone tissue transplants (femoral heads) by moist heat with the ´Marburg bone bank system´ Biologicals 31: 75-82.

Pruss A, Seibold M, Benedix F, Frommelt L, von Garrel T, Gürtler L, Dörffel Y, Pauli G, Göbel UB (2003) Validation of the ´Marburg bone bank system´ for thermodesinfection of allogenic femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores. Biologicals 31: 287-294.

**Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Holger Kiesewetter für die Überlassung des Themas sowie die große Unterstützung bei der Durchführung der Projekte.

Großer Dank gilt Dr. Moujahed Kao, ohne dessen fachliche Kompetenz, großes Engagement und stoische Ruhe die Durchführung der Virusinaktivierungsstudien nicht möglich gewesen wäre. In gleichem Atemzug danke ich Prof. Dr. Georg Pauli, dessen fruchtbare Ideen und Anregungen den ´roten Faden´ der Virusprojekte aufzeigten. Gleichzeitig darf ich mich bei den involvierten Mitarbeitern des Fachbereiches Virologie des Robert Koch-Institutes, insbesondere bei Ursula Erikli, sehr herzlich bedanken.

Für die fachliche Begleitung der Experimente mit den nicht-viralen Erregern danke ich Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel in besonderer Weise. Seine stets kritischen und fachlich exzellenten Hinweise haben die Untersuchungen qualitativ bereichert. Des weiteren danke ich für die umfangreiche Mithilfe bei den Versuchen mit Bakterien, Pilzen, Sporenbildnern und Sporen ganz besonders Dr. Bärbel Baumann, Michael Seibold, Frank Benedix sowie allen beteiligten MTLA und Labormitarbeitern im Robert Koch-Institut und im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité.

Bei den Bestrahlungsversuchen war ich mir der Unterstützung von Dr. Uwe Gohs, Dr. Hans-Joachim Mönig und Bernd Schubarth stets bewusst. Hierfür meinen Dank.

Für die finanzielle Unterstützung bei den Projekten danke ich dem Deutschen Institut für Zell- und Gewebeersatz (Direktor: Dr. Dr. Rüdiger von Versen) und der Firma telos Marburg (Geschäftsführer: Olaf Tulaszewski) sowie Doris Reinhold für die Betreuung und Verwaltung der Drittmittel-Konten.

Meiner Familie und meinen Eltern gilt an dieser Stelle ganz großer Dank dafür, dass sie mich auf diesem Weg immer wieder mit Unterstützung begleitet haben.

Abschließend möchte ich den beiden Mitarbeitern der Gewebebank der Charité meinen ganz persönlichen und besonderen Dank aussprechen, ohne deren selbstlose Hilfe und unermüdliche Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre: Sven Schurig und Frank Schweiger.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 11.12.2003

Dr. med. Axel Pruß