

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Resin-induzierte Sensitivitätserhöhung
der mikrobiologischen Diagnostik in organkultivierten
Augenhornhauttransplantaten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt an der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Zemra Skenderi

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	4
Vorwort	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Anatomie und Physiologie der Augenhornhaut.....	8
1.1.1 Morphologie und Funktion.....	8
1.1.2 Epithel.....	9
1.1.3 Bowman-Membran	9
1.1.4 Stroma	9
1.1.5 Descemet-Membran	9
1.1.6 Endothel.....	10
1.2 Techniken der Hornhauttransplantation (Keratoplastiken).....	10
1.2.1 Perforierende Keratoplastik (PKP)	10
1.2.2 Lamelläre Keratoplastik	11
1.2.2.1 Anteriore lamelläre Keratoplastik (ALK)	11
1.2.2.2 Tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (DALK).....	11
1.2.2.3 Automatisierte Descemet-Endothel-Keratoplastik (DSAEK).....	12
1.2.2.4 Descemet-Membran-Endothel-Keratoplastik (DMEK)	12
1.3 Augenhornhautbanken	13
1.3.1 Gesetzliche Grundlagen.....	14
1.3.2 Voraussetzungen für die Entnahme nach TPG.....	15
1.3.3 Anforderungen an die Augenhornhautbanken, Gewinnung von Spenderhornhäuten und erforderliche Laboruntersuchungen nach AMG	15
1.3.4 Spenderauswahlkriterien	15
1.3.5 Blutuntersuchung des Spenders	16
1.3.6 Augenhornhautentnahme	17
1.3.7 Prozessierung der Spenderhornhaut	18
1.3.7.1 Kultivierung.....	18
1.3.7.2 Kontrolluntersuchungen.....	19
1.3.8 Freigabe der Augenhornhaut	19
1.3.9 Schwerwiegende unerwünschte Reaktionen und schwerwiegende Zwischenfälle nach Augenhornhauttransplantation	19
1.3.9.1 Endophthalmitis und infektiöse Keratitis nach Augenhornhauttransplantation	20
1.3.10 Mikrobiologische Diagnostik und Rolle der Antibiotika.....	21
2 Zielsetzung	23
3 Material und Methoden.....	23
3.1 RESEP.....	23
3.2 UHPLC – Bestimmung von Antibiotika- und Antimykotika-Rückständen	24
3.3 Blutkulturautomat BD BACTEC™ FX.....	25
3.4 BD BACTEC™ Blutkulturmedien.....	25
3.4.1 BD BACTEC™ Plus – Aerobic / F	26

3.4.2 BD BACTEC™ Plus – Anaerobic / F	26
3.5 Vorbereitung von Mikroorganismen und Inokula	26
3.6 Datenanalyse und Statistik	28
4 Ergebnisse	28
4.1 Entfernung der Antibiotika im Hornhautkulturmedium.....	28
4.2 Nachweis des Wachstums der Mikroorganismen mit BD BACTEC™ FX.....	29
4.3 Nachweiszeit bis zum mikrobiellen Wachstum.....	29
4.4 Sensitivität und Spezifität	31
5 Diskussion	31
6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	32
7 Literaturverzeichnis	34
Anteilerklärung	38
Eidesstattliche Versicherung	39
Curriculum Vitae	40
Publikationsliste.....	41
Danksagung.....	42

Abstract

Hornhauttransplantationen (syn. Keratoplastiken) sind eine der erfolgreichsten und am häufigsten durchgeführten Transplantationen weltweit. Das Risiko, eine postoperative Endophthalmitis oder infektiöse Keratitis über eine mikrobiologisch kontaminierte Spenderhornhaut zu erwerben, ist gering. Erfolgt dennoch eine Kontamination, kann dies im schlimmsten Fall zur Erblindung bis hin zum Verlust des Auges führen.

Um ein hohes Maß an Sicherheit zu gewährleisten, muss das Augenhornhauttransplantat mit einer validierten Methode auf mögliche Kontamination vor der Transplantation überprüft werden.

Die aktuell als Goldstandard verwendete Testmethode, das antibiotikahaltige Hornhautkulturmedium mittels Blutkulturautomaten und resinhaltigen Blutkulturflaschen zu untersuchen, wurde ursprünglich vom Hersteller speziell für die Testung von Patientenblutproben, welche relativ geringe Konzentrationen an Antibiotika enthalten, entwickelt und validiert. Wird jedoch ein Hornhautkulturmedium mit einer höheren Antibiotikakonzentration untersucht, kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen, da die Antibiotikaelimination unvollständig ist.

In der vorliegenden experimentellen Studie wird ein neuer innovativer Ansatz zur Eliminierung von Antibiotika aus Proben für mikrobiologische Tests mittels RESEP (AL.CHI.MI.ASrl, Ponte San Nicolò – Padova, Italien) untersucht.

RESEP ist ein patentiertes, CE-zertifiziertes In-vitro-Diagnostikum, das eine Kombination aus Harzen (Resine) in Form von Kügelchen enthält, die dafür geeignet sind, verschiedene Antibiotika zeitgleich aus flüssigen Proben zu adsorbieren, ohne die potenziell darin enthaltenen Bakterien zu entfernen. Die experimentelle Studie verwendet dafür den im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.), Kapitel 2.6.1, beschriebenen Eignungstest sowie die Methodvalidierung in Ph. Eur., Kapitel 2.6.27.

Für die experimentelle Studie wurden 10 bis 100 koloniebildende Einheiten von *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* und *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus epidermidis* und *Enterobacter cloacae* in 9 ml Hornhautkulturmedium inokuliert. Die Studie wurde in zwei Gruppen eingeteilt. In Gruppe A wurde das inokulierte Hornhautkulturmedium für 20 min mit RESEP bei Raumtemperatur durch rotierende Bewegung durchmischt und anschließend in die BD BACTEC™-Plus-aerob/F- und BD BACTEC™-Plus-anaerob/F-Blutkulturflaschen beimpft. In Gruppe B wurde das inokulierte Hornhautmedium direkt in die BACTEC™-Blutkulturflaschen injiziert. Für jeden Stamm wurde eine Positivkontrolle durch direkte Inokulation der Mikroorganismen in BACTEC™-Blutkulturflaschen vorgenommen. Alle Proben wurden im automatisierten BD BACTEC™-FX-Blutkulturautomaten bei 36 °C ± 1 °C für maximal 14 Tage inkubiert. Die benötigte Zeit für die Entfernung von Antibiotika aus dem Medium durch RESEP wurde mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) bestimmt.

Nach 20-minütiger RESEP-Behandlung wurden in Gruppe A alle Mikroorganismen innerhalb von 3 Tagen nach Inkubation mit einer Empfindlichkeit von 100 % (n = 99) nachgewiesen. In Gruppe B betrug die Gesamtsensitivität nur 67,9 % (n = 96).

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Eliminierung der Antibiotika aus dem Hornhautkulturmedium unter Verwendung von RESEP gemäß dem Europäischen Arzneibuch erfolgreich validiert. Durch die Nutzung

des RESEP-Systems in der Routine können antibiotikabedingte falsch-negative Ergebnisse weitestgehend ausgeschlossen und das Risiko einer über die Spenderhornhaut erworbenen Endophthalmitis oder Keratitis auf ein Minimum reduziert werden.

Abstract

Corneal transplants (syn. Keratoplasty) are one of the most successful and most frequently performed transplants worldwide. The risk of contracting postoperative endophthalmitis or an infectious keratitis through a microbiologically contaminated donor cornea is low. If contamination occurs nevertheless, it can lead to blindness or even loss of the eye in the most severe case.

To ensure a high level of safety, the corneal transplant must be examined for possible contamination by using a validated test method. The test method currently used as the gold standard for examining the corneal organ culture medium containing antibiotics, using automatic blood culture and resin-containing blood culture bottles, was originally developed and validated by the manufacturer especially for testing patient blood samples which contain relatively low concentrations of antibiotics. However, if a corneal culture medium with a higher antibiotic concentration is examined, false-negative results can occur caused by incomplete antibiotic elimination.

In the following experimental study, an innovative approach to eliminate antibiotics from samples for microbiological tests using RESEP (AL.CHI.MI.ASrl, Ponte San Nicolò – Padova, Italy) is under review. RESEP is a patented, CE-certified in vitro diagnostic medical device that contains a combination of resins in the form of beads, which are suitable for simultaneously adsorbing different antibiotics from liquid samples without the risk of removing potentially contained bacteria.

The experimental study uses the aptitude test in accordance with European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), chapter 2.6.1, as well as method validation in accordance with Ph. Eur., chapter 2.6.27.

For the experimental study 10–100 colony-forming units of *Staphylococcus aureus* (SA), *Bacillus subtilis* (BS), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Candida albicans* (CA), *Aspergillus brasiliensis* (AB) and *Clostridium sporogenes* (CS), *Staphylococcus epidermidis* (SE) and *Enterobacter cloacae* (EC) were inoculated in 9 ml corneal culture medium. The study was divided in two groups. In group A the inoculated corneal culture medium was treated for 20 minutes with RESEP at room temperature and then injected into the BD BACTEC™ Plus aerobic / F and BD BACTEC™ Plus anaerobic / F blood culture bottles. In group B, the inoculated corneal medium was injected directly into the BACTEC™ blood culture bottles. A positive control was carried out for each strain by direct inoculation of the microorganisms in BD BACTEC™ blood culture bottles. All samples were incubated in automated BD BACTEC™ FX blood culture machines at $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ for a maximum of 14 days. The removal of antibiotics from the medium by RESEP was carried out using ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC).

Following the 20-minute-RESEP treatment, all microorganisms in group A were identified with a sensitivity of 100 % (n = 99) within 3 days after incubation. In group B the overall sensitivity was 67.9 % (n = 96).

In the present work the elimination of the antibiotics from the corneal culture medium by use of RESEP was successfully validated according to the European Pharmacopoeia. The RESEP system therefore provides a new standard procedure to avoid antibiotic-related, false negative results. The risk of contracting endophthalmitis or keratitis, contracted via the donor cornea, can be reduced to a minimum.

Vorwort

Die Kapitel 3, Kapitel 4 und Kapitel 5 der nachfolgenden Arbeit wurden vorab veröffentlicht in:

“Skenderi Z, Giurgola L, Gatto C, D'Amato Tóthová J, Pruß A, Schroeter J. Increased sensitivity of microbiological testing of cornea organ culture medium by additional resin treatment. *BMJ Open Ophthalmology* 2018;3:e000173. doi:10.1136/ bmjophth-2018-000173”.

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Augenhornhaut

Die Hornhaut (syn. Kornea) weist eine komplexe Struktur auf, die unterschiedliche Funktionen am Auge erfüllt. Als vorderste Schicht des Auges dient sie zum einen dem Schutz vor dem Eindringen von Bakterien und Fremdkörpern. Zum anderen trägt sie mit ihrer hohen Brechkraft von 43 Dioptrien (dpt) einen wesentlichen Anteil zur Gesamtbrechkraft des Auges (ca. 58 dpt) bei [1, 2, 3]. Ihre regelmäßige Oberfläche und Transparenz sind demnach für die Bildentstehung auf der Netzhaut von größter Bedeutung [1, 2, 3]. Die Hornhaut ist ein badytrophes, avaskuläres Gewebe, das sich posterior über Kammerwasser und anterior über den Tränenfilm ernährt [1, 2, 3]. Der Abtransport von Stoffwechselprodukten erfolgt auf dem gleichen Weg [1, 2, 3].

1.1.1 Morphologie und Funktion

Die Hornhaut hat bei einem Erwachsenen einen Durchmesser von etwa 11,5 mm und ist von vielen Nervenfasern durchzogen [2, 3]. Sie ist zentral durchschnittlich 535 µm dick [4] und wird zur Peripherie hin dicker. In der Reihenfolge von außen nach innen gliedert sich die Hornhaut in 5 verschiedene Schichten (Abbildung 1 zeigt schematisch die Anatomie der Hornhaut): **Epithel** (Epithelium corneae), **Bowman-Membran** (Lamina limitans anterior), **Stroma** (Substantia propria), **Descemet-Membran** (Lamina limitans posterior) und **Endothel** (Endothelium corneae).

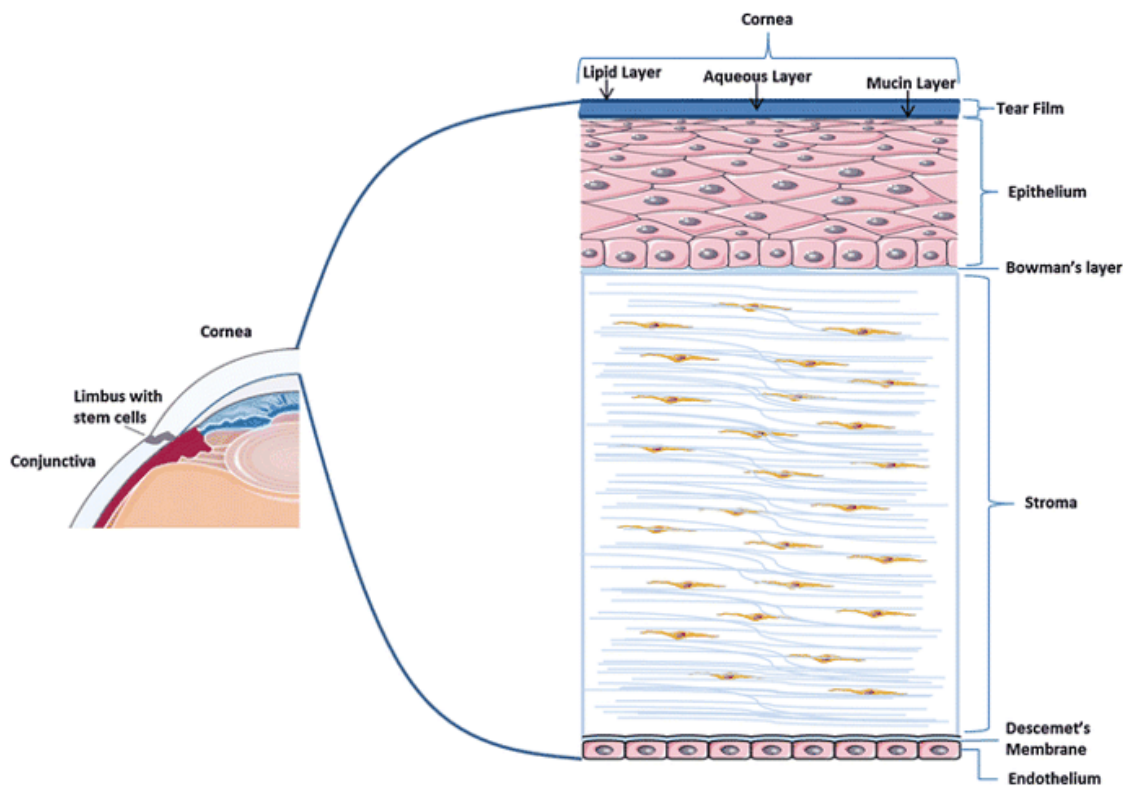


Abbildung 1: Anatomie der Hornhaut. Schematische Darstellung der Hornhaut mit ihren unterschiedlichen anatomischen Schichten: dem Epithel, der Bowman-Membran, dem Stroma, der Descemet-Membran und dem Endothel.
(Bildquelle: Rowsey TG, Karamichos D. The role of lipids in corneal diseases and dystrophies: a systematic review. Clin Transl Med. 2017 Dec;6(1):30. doi: 10.1186/s40169-017-0158-1).

1.1.2 Epithel

Das Epithel ist ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel, das die äußerste Schicht der Hornhaut bildet und von einem dreischichtigen präkornealen Tränenfilm bedeckt ist [1, 3]. Dieser setzt sich aus einer Lipidschicht, einer wässrigen Schicht und einer Muzinschicht zusammen [3].

Die wesentliche Funktion des Tränenfilms ist es, die lichtbrechende Oberfläche der Hornhaut zu glätten und damit die Transparenz der Hornhaut zu sichern [3]. Ohne Tränenfilm ist die Epitheloberfläche rau und damit die optische Qualität der Hornhaut herabgesetzt. Gleichzeitig dient der Tränenfilm durch das bakterizide Ferment Lysozym der Abwehr von Infektionen und ist durch Stoff- und Ionenaustausch für die Ernährung der vorderen Schichten der Hornhaut verantwortlich [3]. Zudem bildet der Tränenfilm einen Gleitfilm für die Augenlider aus.

1.1.3 Bowman-Membran

Die Basalzellen des Plattenepithels sind durch eine dünne Basalmembran mit der sich anschließenden Bowman-Membran fest verankert. Die Bowman-Membran ist eine azelluläre, etwa 10µm dicke Schicht aus verdichteten, zufällig angeordneten Kollagenfibrillen, die kontinuierlich mit der darunterliegenden Stroma-Lamellenstruktur der Hornhaut verschmelzen [5]. Diese ist höchst widerstandsfähig und für die mechanische Festigkeit der Hornhaut und für den Schutz des Stromas zuständig [5]. Sie ist nicht regenerationsfähig, so dass eine Verletzung der Bowman-Membran mit einer Hornhautnarbe abheilt [3, 5].

1.1.4 Stroma

Unterhalb der Bowman-Membran befindet sich das Hornhautstroma, das mit etwa 80 bis 85 % den Hauptteil der Gesamtdicke der Hornhaut ausmacht und für die Transparenz und die mechanischen Eigenschaften des Gewebes von großer Bedeutung ist [6]. Das Stroma hat ungefähr 200 bis 250 Lamellen, von denen jede wiederum aus parallel ausgerichteten Bündeln von Kollagenfasern, hauptsächlich Kollagen vom Typ I, besteht [6]. Die Kollagenbündel benachbarter Lamellen stehen im rechten Winkel zueinander, wodurch es zu einer regelmäßig angeordneten Gitterstruktur kommt [2, 6]. Diese regelmäßige Anordnung sowie die Avaskularität des Stromas und der relativ dehydrierte Zustand (Wassergehalt von 78 %) bedingen die Transparenz der Hornhaut [2]. Eine Veränderung der Gitterstruktur würde deren Brechungsindex verändern und in einer Trübung der Hornhaut resultieren [5].

1.1.5 Descemet-Membran

Die Descemet-Membran ist die Basalmembran des Endothels, ca. 6–10 µm dick und besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ IV und Typ VIII sowie Laminin [2,7]. Die Descemet-Membran hält die Vorderkammer selbst dann aufrecht, wenn das Hornhautstroma (wie etwa infolge einer Entzündung) völlig eingeschmolzen ist [3]. Die Descemet-Membran wird bei Verlust durch funktionstüchtige Endothelzellen neu gebildet [3].

1.1.6 Endothel

Das 5 µm dicke einschichtige Hornhautendothel liegt der Descemet-Membran auf und schließt die Augenhornhaut als die innerste Auskleidung zur Vorderkammer hin ab [7]. Sie besteht aus polygonalen, meist hexagonalen Zellen, deren Hauptaufgabe die Aufrechterhaltung der Dehydratisierung des Stromas ist, indem sie aktiv überschüssige Flüssigkeit aus dem Stroma herauspumpt [1, 7]. Bei der Geburt beträgt die Endothelzellichte 4000 bis 5700 Zellen/mm² [8] und im Erwachsenenalter ungefähr 2000 bis 3000 Zellen/mm² [9]. Die Endothelzellzahl nimmt unter physiologischen Bedingungen jährlich um 0,6 % ab [10]. Bei einem Endothelschaden und -verlust können sich die humanen Hornhautendothelzellen nicht regenerieren, es kommt jedoch zu einer lokalen Umverteilung und Adaptation bestehender Zellen, um den verlorenen Raum zu füllen [1].

1.2 Techniken der Hornhauttransplantation (Keratoplastiken)

Krankheiten und Verletzungen der Hornhaut können zu Narbenbildung, Trübung und Hornhautunregelmäßigkeiten mit anschließender Verzerrung der einfallenden Lichtstrahlen und vermindertem Sehvermögen führen [11]. Durch das Entfernen einer trüben oder irregulär geformten Hornhaut und durch Einsetzen einer klaren, regulär brechenden Spenderhornhaut kann das Sehvermögen bei einer Vielzahl von Hornhauterkrankungen wiederhergestellt werden. Die Transplantation der Hornhaut ist eine der weltweit häufigsten und der am erfolgreichsten durchgeführten Transplantationen in der Medizin [11]. Weltweit werden ungefähr 186.000 Hornhauttransplantationen pro Jahr vorgenommen, alleine ca. 80.000 in den USA [12]. In Deutschland kommt es im Jahr durchschnittlich zu 7.000 bis 8.000 Hornhauttransplantationen. Im Jahr 2016 waren es 7.325 [13] Hornhauttransplantationen, verglichen mit 3.048 [14] Organtransplantationen im selben Jahr (einschließlich Nieren-, Bauchspeicheldrüsen-, Leber-, Darm-, Herz- und Lungentransplantationen).

Abhängig von der Lokalisation der Erkrankung in der Hornhaut des Empfängers, unterscheidet man zwei Arten von Transplantationstechniken, welche sich heutzutage als Routineeingriff etabliert haben. Das klassische Verfahren ist die perforierende Keratoplastik (PKP), bei der der zentrale Teil der erkrankten Hornhaut vollständig entfernt und durch ein Spendertransplantat, das alle fünf Hornhautschichten enthält, ersetzt wird. Die zweite Möglichkeit ist die lamelläre Keratoplastik, wobei gezielt die erkrankten Schichten der Hornhaut transplantiert werden und möglichst die gesunden und funktionsfähigen Anteile erhalten bleiben. Hierbei wird zwischen der vorderen und hinteren lamellären Keratoplastik unterschieden, je nachdem welche Schicht ersetzt werden muss. Im Folgenden werden die verschiedenen Techniken kurz beschrieben.

1.2.1 Perforierende Keratoplastik (PKP)

Die erste erfolgreiche PKP wurde 1905 von Eduard Zirm [15] vorgenommen und galt als der Goldstandard der Transplantationstechniken im 20. Jh., unabhängig davon, welche Schicht betroffen war. In den letzten zwei Jahrzehnten gab es jedoch einen Trend weg von der perforierenden Keratoplastik hin zur lamellären Keratoplastik. Im Jahr 2006 wurden in Deutschland 3515 (96 %) Transplantate für PKP-Operationen verwendet. In 2016 wurden nur noch 2944 (40,1 %) PKP-Operationen durchgeführt [13].

Die perforierende Keratoplastik kann als optische Keratoplastik, sprich Visusverbesserung, durchgeführt oder im Rahmen eines Notfalleingriffes (Keratoplastik à chaud) vollzogen werden [3]. Im Notfall wird sie in ein perforiertes Auge (offenes Auge) oder in ein nicht heilendes Hornhautulkus zur Wiederherstellung oder zum Erhalt der Hornhautintegrität eingesetzt [3]. Klassischerweise ist eine PKP nötig bei Hornhauterkrankungen, die das Hornhautstroma in voller Dicke erfassen, sprich Narben, Dystrophien und Degenerationen, so wie Keratokonus und Keratoglobus mit und ohne zentrale Hornhauttrübung [3]. Das Grundprinzip dieser Technik ist, dem Empfänger die trübe oder irreguläre Hornhaut mit all ihren Schichten in einem variablen Durchmesser zu trepanieren und herauszuschneiden [1, 2]. An dem sog. Empfängerbett wird dann ein klares, regulär brechendes Hornhauttransplantat in voller Dicke und entsprechender Größe wiedereingesetzt und mit doppelläufiger Kreuzstichnaht, seltener mit fortlaufender Naht bzw. bei komplizierten Situationen mit Einzelknopfnähten, fixiert [2, 3]. Im Normalfall sollten die Nähte frühestens 12 Monate nach der Operation entfernt werden [2]. In Abbildung 2 unter Bild A ist ein Auge nach einer perforierenden Keratoplastik mit einzeln geknüpften Hornhautnähten abgebildet.

1.2.2 Lamelläre Keratoplastik

In den vergangenen Jahren ist es durch zahlreiche technische Neuerungen möglich geworden, zielgerichtete Transplantationstechniken durchzuführen, deren Stellenwert immer mehr an Bedeutung gewinnt. Dazu gehören die anteriore lamelläre Keratoplastik (ALK), die tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (DALK – *Deep Anterior Lamellar Keratoplasty*), die automatisierte Descemet-Endothel-Keratoplastik (DSAEK – *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*) und die Descemet-Membran-Endothel-Keratoplastik (DMEK – *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*).

1.2.2.1 Anteriore lamelläre Keratoplastik (ALK)

Bei der anterioren lamellären Keratoplastik werden nur das Hornhautepithel und ein Teil des Stromas exzidiert. Voraussetzung für die Durchführung dieser Technik ist eine intakte Descemet-Membran mit gesundem Hornhautendothel beim Empfänger [3]. Indikationen für ein solches Verfahren sind daher Trübungen und Narben des oberflächlichen Hornhautstromadrittels, eine marginale Hornhautverdünnung oder -infiltration oder eine umschriebene Verdünnung oder Descemetozele [1]. Der Vorteil bei dieser Technik ist ein geringes Abstoßungsrisiko, da das Endothel als Hauptangriffspunkt für Abstoßungsreaktionen nicht transplantiert wird [1]. Aufgrund deutlich schlechterer postoperativer Visusergebnisse im Vergleich zur perforierenden Keratoplastik hat die anteriore lamelläre Keratoplastik im klinischen Alltag dennoch einen geringen Stellenwert [16].

1.2.2.2 Tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (DALK)

Bei der tiefen anterioren lamellären Keratoplastik (Abbildung 1 unter Bild B) wird das Hornhautstroma komplett bis auf die Descemet-Membran beim Empfänger entfernt [16]. Das Transplantat, bei dem die Descemet-Membran zuvor entfernt wurde, wird analog zur perforierenden Keratoplastik eingenäht [16].

Bei diesem Verfahren treffen die Stromalamellen vom Spender und Empfänger nicht aufeinander, sodass es zu minimalen Interfacereaktionen kommt. Dadurch lassen sich deutlich bessere Visusergebnisse als bei der ALK erzielen [16].

Verschiedene Techniken werden verwendet, um das Stroma komplett von der Descemet-Membran zu trennen. Häufig wird die pneumatische Dissektion, die bei Anwar in der „Big-Bubble-Technik“ angewendet wird, durchgeführt. Dabei wird Luft in das tiefe Stroma injiziert, wodurch es zu einer Trennung von Descemet und Stroma kommt [16].

Das Separieren der Descemet-Membran vom darüberliegenden Stroma, ohne sie dabei zu perforieren, stellt eine technische Herausforderung für ophthalmologische Chirurgen da. Die Perforationsrate wird in der Literatur mit 9–39 % der Fälle angegeben und in 37–69 % der Fälle ist deswegen der Umstieg auf eine konventionelle perforierende Keratoplastik indiziert [16]. Voraussetzung für eine DALK ist ebenfalls, dass das Endothel des Empfängers intakt ist. So gelten als primäre Indikationen hierfür der Keratokonus ohne akuten Hydrobs in der Anamnese sowie chronisch entzündliche Erkrankungen wie die atopische Keratokonjunktivitis [1, 16].

1.2.2.3 Automatisierte Descemet-Endothel-Keratoplastik (DSAEK)

Bei dieser Variante der hinteren lamellären Keratoplastik wird beim Empfänger nur das erkrankte Endothel mit der Descemet-Membran ohne Stromaanteil durch eine korneosklerale oder korneale Inzision entfernt (sog. Descemetorhexis) [1, 16, 17]. Das gefaltete lamelläre Transplantat, das aus der Descemet-Membran, aus Endothelzellen und aus Anteilen des hinteren Stromas besteht, wird anschließend durch die gleiche Öffnung mittels spezieller Instrumente in die Vorderkammer implantiert [16]. Sie wird zentral im Bereich der posterioren Hornhaut positioniert und mittels einer Injektion von Luft an die Vorderkammer fixiert [17]. Die Operation erfolgt nahtlos und ist in Abbildung 2 unter Bild C gut zu sehen.

Wird das Spendergewebe manuell präpariert, bezeichnet man das Verfahren als Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty (DSEK) [16]. Verwendet man ein automatisches Mikrokeratom, bezeichnet man diese Variante als Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (DSAEK) [16]. Eine weitere Variante zur Präparation der Spenderhornhaut erfolgt mit einem Femtosekundenlaser (fs-DSAEK) [11, 16]. Die DSAEK ist für Endothelerkrankungen wie die endotheliale Fuchs-Dystrophie, die pseudophake/aphake bullöse Keratopathie und die endotheliale Keratopathie bei Pseudoexfoliationssyndrom indiziert. Prinzipiell kann eine DSAEK auch bei Transplantatversagen nach perforierender Keratoplastik (ohne höhere irreguläre Astigmatismen) möglich sein [17].

1.2.2.4 Descemet-Membran-Endothel-Keratoplastik (DMEK)

Als ein Meilenstein gilt die im Jahr 2006 von Gerrit Melles erstmals erfolgreich durchgeführte DMEK. Die DMEK ist im Grunde eine Weiterentwicklung der DSAEK, bei der ausschließlich die Descemet-Membran und Endothelzellen ohne Stroma transplantiert werden [18].

Diese neue Technik brachte hervorstechende Visusergebnisse – bezogen auf den maximal erreichten Visus (fast 50 % der Patienten erreichen nach 6 Monaten einen Visus von 1.0 oder höher) sowie auch auf die visuelle Rehabilitationsdauer (ein Visus von 0.8 oder höher wird bei jedem zweiten Patienten

bereits nach einem Monat erreicht) [19]. Ein weiterer Vorteil der DMEK-Technik ist die deutlich reduzierte Transplantat-Abstoßungsrate von nur 0,2 % und damit ein 15-fach geringeres Risiko im Vergleich zu einer DSAEK-Behandlung [20]. Aufgrund dieser herausragenden klinischen Ergebnisse hat sich die DMEK zur Behandlung endothelialer Erkrankungen als Goldstandard mittlerweile weltweit etabliert. Auch in Deutschland kann eine Zunahme der durchgeführten hinteren lamellären Keratoplastiken beobachtet werden. Im Jahr 2016 sind die hinteren lamellären Operationstechniken mit 4169 Eingriffen (57 %) um ein 83-Faches gestiegen, im Vergleich zu 2006 mit 50 (1,4 %) realisierten Transplantationen [13]. Ebenso konnte ein 12-facher Anstieg bei der DMEK auf 3850 Eingriffe (53 %) im Vergleich zu 319 DSAEK-Operationen (4,4 %) im Jahr 2016 verzeichnet werden [13]. Die DALK bleibt den Jahren über konstant mit 6 % (269 im Jahr 2011) [13].

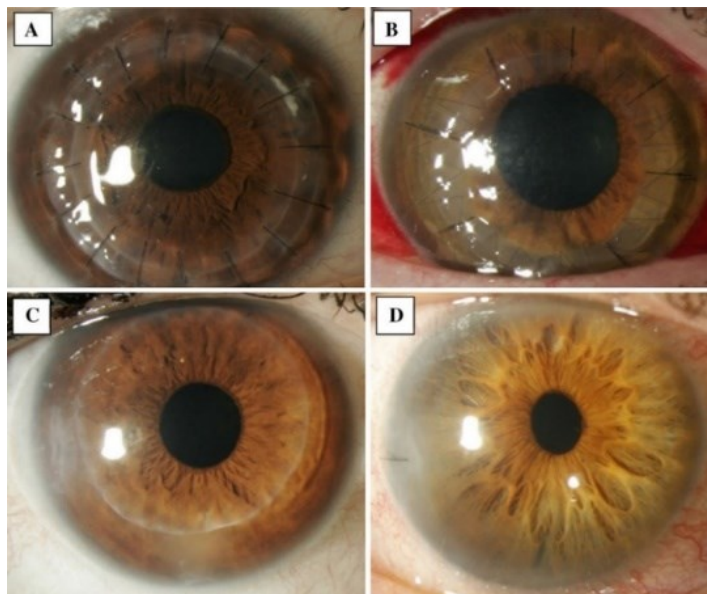


Abbildung 2: Keratoplastiken: A perforierende Keratoplastik, B tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik (DALK), C automatisierte Descemet-Endothel-Keratoplastik (DSAEK), D Descemet-Membran-Endothel-Keratoplastik (DMEK).
 (Bildquelle: Boynton GE, Woodward MA. Evolving techniques in corneal transplantation. *Curr Surg Rep* 2015 February 1;3(2). doi:10.1007/s40137-014-0079-5.

1.3 Augenhornhautbanken

Die erste Augenhornhautbank wurde 1944 von R. Townley Paton in New York City gegründet [21]. Weitere Gründungen von eigenständigen Institutionen folgten rasch. In Deutschland dagegen entwickelten sich solche Banken erst ab etwa 1975 als eigenständige Abteilungen an Universitätskliniken. Aktuell existieren in Deutschland 26 Augenhornhautbanken [22], davon sind 20 an Universitätskliniken angeschlossen [22]. Alle deutschen Augenhornhautbanken versorgen vorrangig ihre eigene Klinik, wobei überzählige Hornhauttransplantate an andere Kliniken und Operateure abgegeben werden. Die Hornhautbanken organisieren sich in einer Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) und über die European Eye Bank Association (EEBA).

Voraussetzung für die erfolgreiche Behandlung des Patienten ist die Bereitstellung eines geeigneten Hornhauttransplantates. Es sollte über eine normale physiologische Funktionalität verfügen und mög-

lichst kein Risiko einer Krankheitsübertragung darstellen. Grundsätzlich unterliegen alle Hornhautbanken denselben Verpflichtungen und Rahmenbedingungen wie Transplantationszentren parenchymatöser Organe [23]. Jede Hornhautbank muss über ein Qualitätsmanagementsystem verfügen und dieses stets auf dem neuesten Stand halten [23].

1.3.1 Gesetzliche Grundlagen

In Deutschland sind die Organ- und Gewebespende und die Transplantation vom Gesetzgeber streng geregelt. Zur Umsetzung der Gesetze sind Richtlinien erforderlich, die wiederum von der Bundesärztekammer verabschiedet und nach der Zustimmung vom Bundesministerium für Gesundheit (BMG) umgesetzt werden [24].

Die rechtliche Grundlage für die Organ- und Gewebespende in Deutschland ist das **Transplantationsgesetz** (TPG). Es trat 1997 in Kraft und wurde 2007 durch das Gewebegesetz um das Thema Gewebespende erweitert. Das Gesetz regelt die Abläufe der Spende, Vermittlung und Transplantation von Organen und Geweben transparent, um so Missbrauch vorzubeugen. Darin sind die Spende nach dem Tod, die Lebendorganspende und die Lebendgewebespende geregelt. Ebenso werden Rechte und Pflichten aller an einer Organ- und Gewebespende Beteiligten genau benannt. Das TPG wurde Anfang 2019 mit dem Zweiten Gesetz zur Änderung des TPG – Gesetz zur Verbesserung der Zusammenarbeit und der Strukturen bei der Organspende (GZSO) – aktualisiert. Durch die Änderung sollen die strukturellen und finanziellen Bedingungen der Entnahmekrankenhäuser gestärkt werden [24].

Im Gegensatz zu den Organen, die nach der Entnahme rasch an die Empfängerin oder Empfänger vermittelt und transplantiert werden, werden Gewebe nach der Entnahme vorerst weiterverarbeitet. Alle Verarbeitungsschritte, vom entnommenen Gewebe bis zum fertigen Gewebeprodukt, reguliert das **Gewebegesetz**. Dadurch wird ein hohes Maß an Sicherheit und Qualität der Gewebeprodukte gewährleistet. Bei dem Gewebegesetz handelt es sich um ein sogenanntes Artikelgesetz, das heißt, es setzt Änderungen an mehreren anderen Gesetzen durch [24]. Die Änderungen durch das Gewebegesetz betreffen vor allem das Transplantationsgesetz (TPG), die TPG-Gewebeverordnung (TPG-GewV), das Arzneimittelgesetz (AMG) und die Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV) [24].

Richtlinien setzen das streng geregelte Transplantations- und Gewebegesetz um. Die Richtlinien werden von der Ständigen Kommission Organtransplantation (StäKO) der Bundesärztekammer erarbeitet und dem Bundesministerium für Gesundheit vorgelegt. Erst nachdem das Ministerium die Richtlinie genehmigt hat, wird sie wirksam [24]. Die Durchführungsrichtlinien Qualitäts- und Sicherheitsstandards von Gewebeprodukten, die Rückverfolgung von Gewebeprodukten und die Meldung schwerwiegender Zwischenfälle werden zusätzlich auf der Europäischen Ebene durch eine EU-Richtlinie, die EG-Geweberichtlinie, geregelt. Die EG-Geweberichtlinie wurde 2004 vom Europäischen Parlament und dem Rat der Europäischen Union erlassen [24].

Gemäß § 16b Abs. 1 TPG wurde die Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut als zuständiger Bundesoberbehörde ergänzend zu den Vorschriften der Rechtsverordnung gemäß § 16a TPG (TPG-GewV) ermächtigt, Richtlinien nach dem allgemeinen Stand der Wissenschaft und Technik zu erlassen, die Standards zur Gewinnung und Herstellung von Augenhornhäuten festlegt, um so die größtmögliche Sicherheit des Empfängers zu gewährleisten [23]. Die Richtlinien definieren die

grundlegenden Standards für alle deutschen Hornhautbanken und bilden die Grundlage für alle Begutachtungen einer Hornhautbank durch die Behörde. Im Folgenden wird kurz auf einige Punkte dieser Standards eingegangen.

1.3.2 Voraussetzungen für die Entnahme nach TPG

Für eine Gewebeentnahme ist neben der medizinisch festgestellten Eignung des Spenders die Zustimmung zur Gewebeentnahme eine unabdingbare Voraussetzung. In Deutschland gilt die Entscheidungslösung. Gemäß §§ 3 und 4 TPG dürfen Augenhornhäute nach dem Tod nur dann entnommen werden, wenn die verstorbene Person eine Einwilligung zur Gewebespende erteilt hat oder dessen Angehörige nach seinem Tod im Sinne des Verstorbenen der Gewebespende zugestimmt haben [23]. Die Möglichkeit zur Hornhautspende kann im Organspendeausweis vermerkt werden. Ist die Einwilligung zur Gewebespende nicht im Organspendeausweis vermerkt, werden die nächsten Angehörigen oder Bevollmächtigten gebeten, durch eine hierzu befugte Person im Sinne des Verstorbenen zu entscheiden. Dies wird dann schriftlich dokumentiert. Hier gilt, dass die zustimmenden Angehörigen in den letzten zwei Jahren vor dem Tod des Gewebespenders in persönlichem Kontakt mit diesem gestanden haben müssen [23].

Darüber hinaus muss die Hirntoddiagnostik entsprechend dem TPG und der „Richtlinie für die Regeln zur Feststellung des Todes“ der Bundesärztekammer nach dem Stand der Wissenschaft durchgeführt werden [23]. Den Hirntod festzustellen bedeutet, die irreversibel erloschene Funktion des gesamten Gehirns bei stabilen Kreislaufverhältnissen oder nach Herz-Kreislauf-Stillstand nachzuweisen. Es dürfen keine Zweifel über die Ursache des Todes bestehen und Medikamenten- oder Toxinwirkung müssen ausgeschlossen sein [23].

1.3.3 Anforderungen an die Augenhornhautbanken, Gewinnung von Spenderhornhäuten und erforderliche Laboruntersuchungen nach AMG

Das Führen einer Hornhautbank unterliegt der strengen Regulierung durch das Arzneimittelgesetz (AMG). Dabei wird zwischen Entnahme, Herstellung, Laboruntersuchungen und Inverkehrbringen von Augenhornhauttransplantaten differenziert. Es dürfen nur Einrichtungen Gewebe oder Augenhornhauttransplantate entnehmen, die über eine Entnahmeerlaubnis der regional zuständigen Landesbehörde gemäß § 20b AMG verfügen [23]. Analog gilt für die Herstellung, Konservierung, Lagerung und Abgabe von Hornhauttransplantaten, dass eine Erlaubnis gemäß § 20c AMG vorliegen muss [23]. Werden die Gewebezubereitungen an Dritte abgegeben, erfordert dies eine zusätzliche Genehmigung (§21a AMG) der Bundesbehörde, des Paul-Ehrlich-Instituts [23]. Ebenso muss die Augenhornhautbank über eine Erlaubnis für die Laboruntersuchungen verfügen oder für diese Untersuchungen ein Labor beauftragen, welches eine solche Erlaubnis besitzt [23]. Liegen keine der genannten Genehmigungen vor und es wird dennoch Gewebe entnommen, hergestellt und in Verkehr gebracht, so gilt dies als Straftat.

1.3.4 Spenderauswahlkriterien

Bevor die ersten Schritte einer Gewebeentnahme in Betracht gezogen werden, ist zu überprüfen, ob der Verstorbene aus medizinischer Sicht zur Spende grundsätzlich geeignet ist. Die Spendereignung

wird mittels einer Risikoanalyse im Zusammenhang mit der Verwendung der Spenderhornhäute ermittelt [23]. Die Risikoanalyse beruht auf einer Anamnese, zweckdienlichen Quellen wie Krankenakten und der Befragung behandelnder Ärzte sowie einer biologischen, postmortalen und sonstigen geeigneten Untersuchung [23]. Auch eine körperliche Untersuchung des verstorbenen Spenders ist vor der Gewebeentnahme durchzuführen, um nach Anzeichen einer Infektionskrankheit oder eines Risikoverhaltens zu überprüfen, die die Eignung der Spender beeinträchtigen würden [23]. Im Folgenden werden nur einige der vielen Faktoren genannt, die gemäß § 3 Abs. 1 TPG-GewV als Ausschlusskriterien für Augenhornhäute gelten: postmortale Zeit über 72 Stunden für Spenderhornhäute, die organ kultiviert werden (Kurzzeitkultivierung [hypotherme Lagerung] – postmortale Zeit über 16 Stunden für Spenderhornhäute), unbekannte Todesursache, Erkrankung unbekannter Ätiologie in der Vorgeschichte, zentralnervöse Erkrankungen unklarer Genese (z. B. Multiple Sklerose), Spender mit malignen Erkrankungen können für Bulbus- und Hornhautspenden in Betracht kommen, ausgenommen Spender mit Retinoblastom, hämatologischen Neoplasien und malignen Tumoren des Augenhintergrunds, Risiko der Krankheitsübertragung durch Prionen (z. B. Creutzfeldt-Jakob), signifikante lokale Infektion der Augen durch Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilze, aktive systemische Infektionen (z. B. Malaria oder Toxoplasmose), eine nachgewiesene oder anamnestisch erhobene HIV-, Hepatitis-B- (außer bei Personen mit nachgewiesenem Immunstatus) oder Hepatitis-C-Infektion und noch viele weitere [23].

1.3.5 Blutuntersuchung des Spenders

Auch wenn Laborbefunde vom Spender bereits vorliegen, werden zusätzlich Blutproben abgenommen und in einem zertifizierten Labor untersucht. Bei allen Spendern müssen gemäß Anlage 3 TPG-GewV mindestens folgende biologische Tests durchgeführt werden:

- | | |
|----------------|--|
| a) HIV 1 und 2 | Anti-HIV 1 und 2 |
| b) Hepatitis B | HBsAg, Anti-HBc |
| c) Hepatitis C | Anti-HCV, HCV-NAT |
| d) Syphilis | Antikörper gegen <i>Treponema pallidum</i> |

HTLV-I-Antikörpertests sind bei Spendern vorzunehmen, die in Gebieten mit hoher Prävalenz leben oder von dort stammen oder deren Sexualpartner oder Eltern aus solchen Gebieten stammen [23].

Die Laboruntersuchungen der verstorbenen Spender können gemäß Anlage 3 der TPG-GewV entweder aus Blutproben verwendet werden, die bis zu 7 Tage vor dem Tod entnommen wurden, oder, falls dies nicht möglich ist, aus postmortalem Blut [23]. Allerdings gilt hier, dass die Blutproben so schnell wie möglich und nicht später als 24 Stunden nach dem Tod entnommen werden müssen (Todeseintritt des Spenders definiert als Zeitpunkt des Herz-Kreislauf-Stillstands bzw. des „Perfusionsstopps“) [23]. Erfolgt die Blutentnahme später, ist die Verwendung des Gewebes nicht erlaubt. Diese Regelung durch die Europäische Union wird von der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) stark kritisiert, die statt dessen fordert, Hornhautgewebe von der Regelung auszunehmen. Die Sicherheit der Hornhautempfänger werde kaum erhöht, bedinge jedoch die Verschärfung der Knappheit an Transplantaten. Die vollständige Abklärung einer Hornhautspende einschließlich des Gesprächs mit den Angehörigen ist häufig innerhalb der 24 Stunden nicht realisierbar, so sind in Deutschland in der ersten Hälfte 2010 etwa 1600 Transplantate aufgrund dieser Regelung ausgeschlossen worden [25].

Obwohl in der gesamten Literatur keine Fälle von Übertragung von HIV-Infektion, Syphilis, Hepatitis C, Hepatitis A, Tuberkulose (TB), des humanen T-Zell-Lymphotropie-Virus-1 (HTLV) und der HTLV-2-Infektion sowie von aktiver Lepra, aktivem Typhus, Pocken und aktiver Malaria durch Hornhauttransplantation beschrieben wurden, bleiben diese Infektionskrankheiten als Kontraindikationen gegen eine Transplantation für alle nationalen und internationalen Hornhautbanken bestehen [26].

Übertragung von Krankheiten durch das Spenderhornhautgewebe wurden für das Adenokarzinom, Tollwut, das Hepatitis-B-Virus (HBV), Cytomegalievirus (CMV), Herpes-simplex-Virus (HSV) und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) sowie eine Vielzahl von bakteriellen Erkrankungen und Pilzinfektionen berichtet [26]. Im März 2016 empfahl die FDA, Organe von Personen, die zuvor mit dem Zika-Virus infiziert waren, auszuschließen [26]. Auch auf der europäischen Ebene hat das „Europäische Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC)“ Risikobewertungen und Bereitschaftspläne erstellt, wobei potentielle Spender mit ungeklärten Infekten aus der Zika-Virus-Region ausgeschlossen werden [27].

1.3.6 Augenhornhautentnahme

Prinzipiell unterscheidet man zwischen zwei Entnahmemethoden: zum einen die Corneoskleralkomplexentnahme und zum anderen die Entnahme des gesamten Bulbus. Bei der Bulbusentnahme kommt es erst im zweiten Schritt zur Abpräparation der Corneoskleralscheibe. Um das Risiko einer Kontamination des zu entnehmenden Gewebes, aber auch der Eigengefährdung zu minimieren, erfolgt die Augenhornhautentnahme unter aseptischen Bedingungen (analog zu einem ophtho-chirurgischen Eingriff am lebenden Patienten). Dies erfordert die ordnungsgemäße Desinfektion der Hände (chirurgische Händedesinfektion), das Tragen steriler Kittel sowie steriler Handschuhe, Schutzmaske und Kopfschutz, das Arbeiten mit sterilem Entnahmebesteck und in sauberen Räumen (z. B. pathologische oder rechtsmedizinische Institute, Prosekturen), in denen der Entnahmebereich mit sterilen Tüchern abgedeckt wird (lokaler steriler Bereich) [23]. Eine weitere Maßnahme ist die Haut- und Bindehautdesinfektion mit einem geeigneten Desinfektionsmittel (z. B. 1–10 % PVP-Jod) noch vor der Entnahme. Mehrere Studien haben gezeigt, dass etwa 52 bis 100 % der unbehandelten Spenderhornhaut kontaminiert sind [28]. Folglich ist die Desinfektion der Spenderaugen vor Entnahme ein wichtiger Schritt, um Kontaminationen während der Organkultur zu verhindern. Durch Spülen des Auges und anschließende Behandlung mit Povidon-(PVP-) Jodlösung kann die mikrobielle Belastung um bis zu 98 % gesenkt werden [28]. Trotz der Desinfektion des Auges mit PVP-Jodlösung kann nicht von einer Sterilität des Ausgangsmaterials ausgegangen werden. Da die Augenhornhaut weder chemisch sterilisiert noch thermisch desinfiziert werden kann, ohne ihre biologische Funktion zu verlieren, wird das Transplantat nach einer Corneoskleralkomplexentnahme in einem sterilen Kunststoffbehälter und antibiotikahaltigen Medium transportiert [23]. Für die Bulbusentnahme wird zunächst ein steriler Schraubbehälter mit physiologischer Elektrolytlösung verwendet und erst im Anschluss, nach Präparation der Corneoskleralscheibe, im Antibiotikamedium gelagert [23]. Das entnommene Gewebe wird mit einer Kontaktlinse oder Prothese ersetzt und der Leichnam in einem würdigen Zustand übergeben [23].

1.3.7 Prozessierung der Spenderhornhaut

1.3.7.1 Kultivierung

Nach dem Eintreffen in der Hornhautbank werden die Transplantate unter Quarantäne aufbewahrt, bis sie samt den zugehörigen Unterlagen nach den Vorschriften und Spezifikationen der Hornhautbank überprüft worden sind [23]. Grundlegend werden die Spenderhornhäute so kultiviert, dass ihre Merkmale und biologische Funktion vollständig erhalten bleiben [23]. Im Prinzip existieren zwei Arten von Kultivierung, die Kurzzeitkultur (hypotherme Lagerung) und die Organkultur. Die hypotherme Lagerung erfolgt bei 2–8 °C [23] mit einer möglichen Aufbewahrungsdauer der Spenderhornhäute bis zu 7–10 Tagen [36]. Die Hornhautbanken im nordamerikanischen Raum verwenden überwiegend eine Kurzzeitkultur von maximal 7 Tagen bei 4 °C [30]. Anders in Europa, hier ist die Organkultur die häufigste verwendete Methode zur Lagerung der Hornhaut [30]. Die Organkultivierung wird auch in der Abteilung der Gewebebank der Charité verwendet. Bei der Organkultur werden die Spenderhornhäute bei einer Temperatur zwischen +30 °C und +38 °C [23] gelagert, wobei hier die Aufbewahrungsdauer von bis zu 4–5 Wochen [29] möglich ist. Ein wesentlicher Punkt zur Gewährleistung der Qualität und Sicherheit der Spenderhornhaut ist das verwendete Kulturmedium. Das am häufigsten verwendete Medium für die Kurzzeitkultivierung ist Optisol GS (Bausch & Lomb, Irvine, California, USA), eine Zusammensetzung aus dem „tissueculture“-Medium (TC 199) und einem „minimal essential medium“ (MEM), dem entquellenden Agentien Dextran 40 (MW 40 000) und Chondroitinsulfat. Das Medium wird mit den Antibiotika Gentamicin und Streptomycin angereichert, jedoch ohne ein Antimykotikum [29, 31, 32]. Der Vorteil dieses Konservierungssystems besteht in der einfachen Handhabung [29, 32]. In der Kurzzeitkultur muss eine mikrobiologische Diagnostik des Kulturmediums nicht vorgenommen werden (Ausnahme bildet hier eine visuell sichtbare Trübung des Mediums) [29, 33]. Für die Organkultivierung wird meist das modifizierte „minimal essential medium“ (MEM) mit einem fetalen Kälberserum, den Antibiotika Penicillin und Streptomycin und dem Antimykotikum Amphothericin B verwendet [32]. Das zugesetzte Rinderserum muss bestimmte Voraussetzungen erfüllen: 1. der Monografie Ph. Eur. 5.2.8 im Hinblick auf die Minimierung eines BSE-Risikos (EDQM/TSE-Zertifikat) entsprechen, 2. negativ auf Mycoplasmen getestet sein, 3. steril sein, 4. der Monographie Ph. Eur. „Bovine serum“ entsprechen und dementsprechend virusinaktiviert sein [23].

Die wesentlichen Vorteile der Organkultur sind die längere Konservierungszeit von bis zu 4 Wochen, die damit verbundene bessere Verfügbarkeit des Gewebes für Routine- und Notfalltransplantate und die Möglichkeit der eventuellen Gewebetypisierung bzw. des HLA-Matchings [36, 39]. Zusätzlich kann wegen der Dauer der Lagerung eine eingehendere mikrobiologische Untersuchung stattfinden, die eine mögliche mikrobielle Kontamination noch vor der Transplantation ausschließt, sowie das Endothel evaluiert werden.

Zur Vorbereitung der Transplantation wird die organkultivierte Spenderhornhaut 24 Stunden vorher in ein Entquellungsmedium/Transportmedium überführt, welches mit 4–8 % Dextran 500 (MW 500 000) angereichert ist [29].

1.3.7.2 Kontrolluntersuchungen

Die Spenderhornhäute werden während der gesamten Kultivierung kontrolliert und untersucht. Zum einen wird die Endothelzellschicht sowohl nach Eingang in die Hornhautbank als auch vor der Transplantation mikroskopisch untersucht. Dabei wird die Gesamtendothelfläche begutachtet und die zentrale Endothelzelldichte durch eine standardisierte und etablierte Zählmethode ermittelt.

Spenderhornhäute, bei deren Eingangsprüfung eine Endothelzellschicht mit weniger als 1000 Endothelzellen pro mm² ermittelt wurde, werden ausgesondert. Spenderhornhäute, bei deren Endprüfung eine Endothelzelldichte zwischen 1000 und 2000 Endothelzellen pro mm² ermittelt wurde, dürfen nur für eine vordere lamelläre Keratoplastik, tektonische Keratoplastik, ein Stroma-Patch und eine perforierende Keratoplastik für temporären Hornhautersatz verwendet werden [23].

Des Weiteren werden die Transplantate mittels Spaltlampe auf sichtbare pathologische Veränderungen hin untersucht. Dabei wird auf die Epithelbeschaffenheit, auf Hornhautnarben, Stromatrübungen sowie Stromadefekte geachtet. Als Ausschlusskriterium gelten optisch relevante, zentral liegende Stromatrübungen oder -veränderungen (z. B. Narben), Stromaveränderungen infektiöser Genese, Guttae der Endothelzellschicht oder eine sich ablösende Descemet-Membran [23]. Auch ein ausgeprägter Pleomorphismus (unterschiedliches Erscheinungsbild verschiedener Zellen) oder Polymegatismus (unterschiedliche Zellgrößen) der Endothelzellen führt zum Verwerfen der Hornhaut [23].

Das Kulturmedium wird regelmäßig makroskopisch auf Anzeichen einer mikrobiologischen Kontamination hin überprüft, wie Trübung oder Änderung der Indikatorfarbe des Mediums oder ungewöhnliche Ablagerungen in der Flasche [23]. Insbesondere ist auf das Aussehen der Corneoskleralscheibe zu achten, da sich hier gerne *Candida* spp. „verstecken“, und erst bei leichtem Schütteln erscheinen sichtbare Flocken und Schlieren im Kulturmedium. Das Kulturmedium wird alle 5–7 Tage gewechselt, dabei wird zum Ausschluss einer etwaigen Kontamination eine Sterilprobe entnommen und einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen (s. Kapitel 5, Mikrobiologische Diagnostik und Rolle der Antibiotika).

1.3.8 Freigabe der Augenhornhaut

Wenn alle Unterlagen ordnungsgemäß dokumentiert vorliegen und alle Spezifikationen erfüllt sind, werden die Augenhornhäute von der verantwortlichen Person gemäß § 20c AMG zur Transplantation freigegeben [23].

1.3.9 Schwerwiegende unerwünschte Reaktionen und schwerwiegende Zwischenfälle nach Augenhornhauttransplantation

Jede Gewebebank ist gesetzlich dazu verpflichtet, jeden Verdacht einer schwerwiegenden Reaktion zu dokumentieren und an die Bundesbehörde (Paul-Ehrlich-Institut) zu melden [23]. Darüber hinaus überwachen unter anderem zwei weitere Organisationen Augenhornhauttransplantationen aktiv professionell, die Eye Bank Association of America (EBAA) und European Eye Bank Association (EEBA). In dem veröffentlichten Bericht der Eye Bank Association of America aus den Jahren 2007 bis 2014 wurden nach 354.930 durchgeführten Augenhornhauttransplantationen 494 Zwischenfälle gemeldet. An erster Stelle wurde ein primäres Transplantatversagen in 319 Fällen angegeben, gefolgt von 99 Fällen Endophthalmitis und Keratitis in 66 Fällen [34]. Im Jahr 2016 wurden von der European Eye Bank Association

in 15 Fällen primäres Transplantatversagen berichtet, 2 Endophthalmitisfälle und insgesamt 407 Zwischenfälle, von insgesamt 27.275 durchgeführten Augenhornhauttransplantationen [35]. Aus Perspektive dieser Studie sind eine erworbene Endophthalmitis und Keratitis nach einer Augenhornhauttransplantation von großer Bedeutung.

1.3.9.1 Endophthalmitis und infektiöse Keratitis nach Augenhornhauttransplantation

Unter Endophthalmitis versteht man eine intraokulare Entzündung des gesamten Auginnenere mit Beteiligung des Glaskörpers [2]. Je nach Pathogenese unterscheidet man zwischen einer endogenen (metastatischen) und exogenen Endophthalmitis [2]. Die endogene Endophthalmitis entsteht durch hämatogene Verschleppung von Keimen, z. B. bei Allgemeininfektionen mit Staphylokokken oder Streptokokken oder bei lang liegenden arteriellen oder venösen Kathetern. Bei der exogenen Endophthalmitis werden die Keime im Zuge einer intraokularen Augenoperation oder bei einer perforierenden Augenverletzung eingeschleppt [2]. Die Entzündung verläuft foudroyant im hinteren Augenabschnitt, sodass es schnell zu einer Eiteransammlung im Glaskörper kommt. Insbesondere die exogene bakterielle Endophthalmitis ist äußerst bedrohlich, da sie nicht selten zur Erblindung oder zum Verlust des Auges führt [2]. Bei Candida-Endophthalmitis ist der Verlauf langsamer als bei der bakteriellen Endophthalmitis. Es zeigen sich weiße der Netzhaut aufsitzende Infiltrate, die in den Glaskörper hineinragen [2]. Infolge der Glaskörpertrübung beziehungsweise der zentralen Lage des Pilzherdes tritt eine Sehverschlechterung auf [2]. Durch eine unmittelbare Vitrektomie des infizierten Glaskörpers kann das Auge gerettet werden [2].

Eine Keratitis kann alle Schichten der Hornhaut einbinden, isoliert oder in Kombination [2]. Es gibt viele unterschiedliche Ursachen, die zu einer Keratitis führen können, z. B. durch verschmutzte oder zu lange getragene Kontaktlinsen, Abwehrschwäche, Diabetes mellitus oder Verletzung der Hornhaut [2]. Bei einer bakteriellen Keratitis wandern die Leukozyten in die Hornhaut ein und es kommt zu einer eitrigen entzündlichen Reaktion, die sich über die Bowmann-Membran hinaus erstreckt: Es entsteht ein bakterielles Hornhautulkus [2]. Dies wird am häufigsten durch Staphylokokken und Pneumokokken ausgelöst. Ein besonders gefährlicher Keim ist *Pseudomonas aeruginosa*: Bei einer Infektion mit ihm kann die Hornhaut durch die Leukozytenenzyme innerhalb von Stunden einschmelzen und zu einer Endophthalmitis führen [2]. Die gefährlichste Verlaufsform des Hornhautulcus ist das Ulcus serpens, weil es je nach Erreger innerhalb von Stunden oder wenigen Tagen zu einer Perforation der Hornhaut mit Verlust des Auges kommen kann [2]. Bei der Pilzkeratitis verläuft die Entzündung im Vergleich wesentlich langsamer ab. In der Hornhaut finden sich weiße Infiltrate, auch in Form von Satelliten. Es entsteht ein zeltförmig zentral nach oben gezogenes Hypopyon (Eiterspiegel in der Vorderkammer) [2]. Der häufigste Erreger ist *Candida albicans*, selten Aspergillus (Schimmelpilz) [2].

Das Risiko, eine Endophthalmitis oder infektiöse Keratitis über die Spenderhornhaut zu erwerben, ist gering und dennoch bleibt es eine der schwerwiegendsten Komplikationen nach einer Keratoplastik [36,37,38,39,40]. Es folgt eine langwierige medizinische Therapie, die in vielen Fällen weitere chirurgische Eingriffe erfordert. Das visuelle Ergebnis ist oft schlecht [33] und wie zuvor beschrieben kann es im schlimmsten Fall zur Erblindung bis hin zum Verlust des Auges führen [2, 41]. Die Mehrzahl der Berichte über postkeratoplastische Infektionen vor 2007 enthalten eine überwiegende Anzahl an bakteriellen Infektionen im Zusammenhang mit einer perforierenden Keratoplastik [42]. Neuere Berichte aus

den USA haben jedoch einen zunehmenden Trend von Pilzinfektionen (Candida-Infektionen) aufgezeigt, die doppelt so häufig nach einer endothelialen Keratoplastik auftreten wie nach einer perforierenden Keratoplastik [34, 43]. Dies steht möglicherweise zum einen mit der weit verbreiteten Einführung der endothelialen Keratoplastik in den letzten 10 Jahren im Zusammenhang [34, 43]. Auf der anderen Seite verringerte sich nach Einführung von Optisol-GS die Wahrscheinlichkeit einer bakteriellen Endophthalmitis aufgrund einer durch einen Pilz erworbenen Endophthalmitis um 77 % [42]. Die Eye Bank Association of America meldete einen statistisch signifikanten Anstieg der Inzidenz postoperativer Keratitis und Endophthalmitis von 2 Fällen pro 10.000 ausgeführten Augenhornhauttransplantationen im Jahr 2007 auf 7,3 Fälle im Jahr 2013 [34]. Die Mehrheit der Infektionen war pilzinduziert, überwiegend mit *Candida* spp. [34]. In einer Metaanalyse von Hassan und Wilhelmus wurde für transplantierte Augenhornhäute mit mikrobiologisch positiv getesteter Hornhautkultur das Risiko einer bakteriellen Endophthalmitis mit 1 % und einer pilzinduzierten Endophthalmitis mit 3 % geschätzt [44]. Aldave *et al.* zeigen, dass ungefähr drei Viertel der untersuchten Partnerhornhäute, die beim Empfänger eine Pilzinfektion hervorgerufen haben, selbst eine positive Pilzkultur aufweisen und die Hälfte davon selbst eine Pilzinfektion beim Empfänger hervorgerufen hat [43]. Lau *et al.* weisen darauf hin, dass die erworbenen Pilzinfektionen nach einer endothelialen Keratoplastik eher mit Augenhornhäuten, die in Kurzzeitkultur (12 von 2386 [0,50 %]) kultiviert werden, assoziiert sind als mit Hornhäuten, die organokultiviert (3 von 14.476 [0,02 %]) werden [33]. Das Ergebnis ist unter Vorbehalt zu bewerten, da nicht alle Hornhautbanken in Europa dem EEBA angeschlossen sind [33] und deshalb nicht alle Daten organokultivierter Hornhauttransplantate, die eventuell mit postoperativen Infektionen im Zusammenhang stehen, zur Auswertung verfügbar sind.

1.3.10 Mikrobiologische Diagnostik und Rolle der Antibiotika

Ogleich die Entnahme von Gewebe unter aseptischen Bedingungen erfolgt und die vorgegebenen Standards eingehalten werden, sind die meisten Transplantate dennoch kontaminiert oder mit physiologischer Standortflora besiedelt. Vignola *et al.* berichten, dass 67 % der entnommenen humanen Augenhornhäute bereits beim Eintreffen in der Gewebebank trotz Desinfektion mit Povidon-Jodlösung auf der Grundlage der EEBA-Richtlinien kontaminiert sind [45]. Röck *et al.* zeigten, dass Kontaminationen nach medizinischen Kontraindikationen und schlechter Endothelqualität als dritthäufigste Ursache für das Verwerfen von Augenhornhäuten verantwortlich sind [46]. Zu den Hauptfaktoren für eine Kontamination zählen der Zeitpunkt der Entnahme und der Entnahmeort [28, 47]. Die maximale postmortale Zeit beträgt 72 Stunden, es ist jedoch anzustreben, die Entnahme innerhalb von 24 Stunden nach Todeszeitpunkt des Spenders [28] durchzuführen. Gewebe, welches im OP-Saal entnommen wurde, weist eine niedrigere Kontaminationsrate auf als im Sektionsraum entnommenes Gewebe [47].

Ein weiterer Hauptfaktor ist die Todesursache. Infektionen wie bakterielle Septikämie oder systemische Infektionen erhöhen das Risiko einer mikrobiellen Kontamination der Augenhornhaut während der Organokultivierung [46]. Einige Studien weisen darauf hin, dass die Kontaminationsrate der in Kultur gelagerten Augenhornhäute jahreszeitabhängig ist [34]. In der Studie von Röck *et al.* konnte ein signifikanter Anstieg der Kontaminationsrate organokultivierter Augenhornhäute in den Sommermonaten im Vergleich zu den kühleren Monaten nachgewiesen werden [46].

Bevor die Freigabe des Gewebes für eine Transplantation erteilt wird, muss das Augenhornhauttransplantat demnach mit einer validierten Testmethode gemäß der Europäischen Pharmakopöe Kapitel 2.6.1 [48] und Kapitel 2.6.27 [48] auf mögliche Kontamination überprüft werden. Dazu wird das Medium untersucht, in dem die Augenhornhaut kultiviert wird. Die im Kulturmedium enthaltenen Antibiotika Penicillin G und Streptomycin sowie das Antimykotikum Amphotericin B reduzieren die mikrobielle Kontamination der Augenhornhaut während der Lagerung, die möglicherweise der ersten Dekontamination widerstanden hat [45]. Röck *et al.* haben in ihrer Studie 1340 organkultivierte Augenhornhäute retrospektiv analysiert und konnten eine durchschnittliche jährliche Kontaminationsrate von $1,8 \pm 0,4$ % feststellen, wobei 50 % der Kontaminationen mykösen Ursprungs mit ausschließlich *Candida* Spezies und 50 % der Kontaminationen bakteriellen Ursprungs überwiegend *Staphylococcus* Spezies aufweisen [46]. Vignola *et al.* konnten die Kontaminationsrate nach 7 Tagen Organkultivierung auf 14 % reduzieren [45]. Je nach Studie schwankt die Kontaminationsrate zwischen 0,53 und 15,7 % [46].

Die im Kulturmedium enthaltenen Antibiotika und Antimykotika weisen neben bakteriolytischen auch bakteriostatische Wirkmechanismen auf. Diese bakteriostatische, also wachstumshemmende Wirkung kann über die Inkubationsphase hinweg weiterhin noch gegenwärtig sein [49] und stellt ein potenzielles Risiko dar, falsch-negative Testergebnisse zu generieren [48, 49]. Die Mikroorganismen werden in ihrem Wachstum und in ihrer Vermehrung gehindert, jedoch nicht abgetötet. So können evtl. vorhandene „ruhende Keime“ in der Testphase nicht detektiert werden und sich nach Abklingen der antibiotischen Wirkung weiter vermehren [49], mit verheerenden klinischen Auswirkungen für den Empfänger des Transplantates (s. Kapitel 3.9 Endophthalmitis und infektiöse Keratitis nach Augenhornhauttransplantation). Jede Augenbank sollte dementsprechend eine geeignete und validierte Methode für die mikrobiologische Untersuchung der Hornhautkulturmedien auswählen, um die Zuverlässigkeit des mikrobiologischen Ergebnisses zu gewährleisten.

Für die mikrobiologische Untersuchung stehen zwei klassische mikrobiologische Prüfmethode zur Auswahl, die konventionellen manuellen Methoden und der Einsatz von Blutkulturautomaten.

Bei der manuellen Methode erfolgt die Detektion von mikrobiologischem Wachstum visuell durch Nachweis von Trübung oder Farbveränderung [48]. Man unterscheidet hier zwischen der Membranfilter-Methode und der Direktbeschickung.

Bei der Membranfilter-Methode wird die zu testende Probe mit Antibiotikazusatz auf eine speziell dafür aufbereitete Filtermembran gebracht und filtriert. Im Anschluss daran wird die Filtermembran mit einer sterilen Flüssigkeit, welche inaktivierende Substanzen enthält, gewaschen [48]. Der Waschvorgang ist jedoch limitiert, sodass die Inaktivierung der antimikrobiellen Aktivität mitunter nicht vollständig erfolgen kann [48]. Die Filtermembran wird anschließend in ein geeignetes Nährmedium überführt.

Bei der Direktbeschickung wird eine vorgegebene Menge an Probenvolumen, maximal 10 %, direkt in das Nährmedium übertragen [48]. Für Proben mit Antibiotikazusätzen wird eine Neutralisation durch Zusatz eines geeigneten Mittels oder durch Verdünnung mittels Nährmedium erreicht [48,49]. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass im größeren Gesamtvolumen die Wahrscheinlichkeit besteht, vorhandene Mikroorganismen nicht zu detektieren (Probeentnahmefehler) [49].

Als goldener Standard gilt die mikrobiologische Kontrolle mittels Blutkulturautomaten. Die Detektion erfolgt automatisch, ist schneller und weist gegenüber der manuellen Prüfmethode eine höhere Empfindlichkeit auf [48]. Die zu testende Probe wird mittels kommerziell erworbener Blutkulturflaschen, die zur

Inaktivierung der antimikrobiellen Aktivität Resine (Kunstharze) enthalten, untersucht. Dieses in europäischen Augenbanken weit verbreitete Blutkultursystem wurde vom Hersteller speziell für die Verwendung von Patientenblutproben, welche relativ geringe Konzentrationen an Antibiotika enthalten, entwickelt und validiert. Die Verwendung anderweitiger Proben mit höheren Konzentrationen an Antibiotika kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen, da die Antibiotikaelimination unvollständig ist [45, 50, 51, 52]. Gain *et al.* konnten die Eignung automatisierter Blutkultursysteme für die mikrobiologische Untersuchung von Hornhautkulturmedien evaluieren [53]. Die möglichen falsch-negativen Ergebnisse, die bei der mikrobiologischen Untersuchung von Proben aufgrund des Vorhandenseins von antibiotischen Rückständen in Konservierungs- und/oder Transportmedien erzielt werden können, werden nicht immer berücksichtigt [45]. In der Gewebebank der Charité haben wir zuvor die mikrobiologische Testung unseres Hornhautkulturmediums mit dem automatisiertem Blutkultursystem BD BACTEC™ untersucht und konnten für den Sporenbildner *Bacillus subtilis* ein falsch-negatives Ergebnis aufzeigen [50].

2 Zielsetzung

Um die mikrobiologische Sicherheit des Patienten zu gewährleisten, ist es von großer Bedeutung, ein keimfreies Transplantat zur Verfügung zu stellen. Dementsprechend muss eine geeignete und validierte Methode für die mikrobiologische Untersuchung der antibiotikahaltigen Hornhautkulturmedien eingesetzt werden, welche die Zuverlässigkeit des mikrobiologischen Ergebnisses gewährleistet und möglichst durch unvollständige Antibiotikaelimination verursachte falsch-negative Ergebnisse ausschließt. In der vorliegenden experimentellen Studie wird ein neuer innovativer Ansatz zur Eliminierung von Antibiotika aus Proben für mikrobiologische Tests mittels RESEP (AL.CHI.MI.ASrl, Ponte San Nicolò – Padova, Italien) untersucht. Die experimentelle Studie verwendet den im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.), Kapitel 2.6.1, „Prüfung auf Sterilität“, beschriebenen Eignungstest sowie die Methodvalidierung in Ph. Eur., Kapitel 2.6.27, „Mikrobiologische Kontrolle zellulärer Produkte“.

3 Material und Methoden

3.1 RESEP

RESEP ist ein patentiertes, CE-zertifiziertes In-vitro-Diagnostikum, das eine Kombination aus Harzen (Resine) in Form von Kügelchen enthält, die dafür geeignet sind, verschiedene Antibiotika zeitgleich aus flüssigen Proben zu adsorbieren, ohne dabei die potenziell darin enthaltenen Bakterien zu entfernen.

Die in RESEP enthaltenen Harze umfassen synthetische Ionenaustauschharze (Ionic exchange resin) und nichtionogene Adsorberharze (hydrophobic adsorption resin) [54], die durch Polymerisations-, Polyadditions- oder Polykondensationsreaktionen hergestellt werden [55]. Durch die Zugabe von Divinylbenzol entsteht ein räumlich (3-dimensional) vernetztes Polymer, welches die Auflösung des Materials in organischen Lösungsmitteln verhindert [55, 56]. Das am meisten verbreitete Ionenaustauschharz basiert auf Polystyrol, das durch Co-Polymerisation (Polymerisation zweier unterschiedlicher Monomere) von Divinylbenzol mit Styrol entsteht [56]. An den zugänglichen Stellen der Matrix können nachträglich zur Dissoziation befähigte funktionelle Gruppen eingeführt werden, die kovalent gebunden sind [56].

Je nachdem welche Art von Ionen ausgetauscht wird, können die Ionenaustauschharze entweder ein Anionen- oder ein Kationenaustauscher sein. Im Fall eines Kationenaustauschers ist die aktive Gruppe eine anionische Gruppe, wie beispielsweise Sulfonsäuregruppen mit abdissoziierbarem Kation [57]. Bei den Anionenaustauschern ist eine basische Gruppe, wie beispielsweise die quartäre Ammoniumgruppe, die aktive Gruppe mit abdissoziierbarem Anion. Amphotere Austauscher können gleichzeitig Anionen und Kationen austauschen [57]. Die Harze liegen in Form kleiner Perlen (Kügelchen) vor und sind typischerweise porös, was eine große Oberfläche ergibt [56]. Im Allgemeinen besitzen die Harze eine kleine Porengröße, so dass Bakterien nicht in das Innere des Harzes eindringen können [54]. Bestimmte Harze weisen dagegen eine makroporöse Struktur mit großen inneren Oberflächen auf, die es großen Molekülen ermöglichen, in das Innere einzudringen. Solche makroporösen Harze sollten vermieden werden, da die Bakterien eingefangen und damit aus der zu testenden Probe entfernt werden können. Folglich sollten Harze verwendet werden, die kleinere Poren aufweisen (mikroporöse Harze), wobei die Adsorption hauptsächlich an den äußeren Oberflächen der Harze erfolgt [54].

Allgemein geschieht die Entfernung von Antibiotika aus flüssigen Proben nach dem Grundprinzip des Ionenaustauschers. Der Ionenaustausch ist ein Prozess, bei dem die Trennleistung aufgrund der Ladung der Ionen und bei gleicher Ladung aufgrund der Größe des Ionenradius beruht. Das mobile Ion auf dem Harz wird mit einem Ion gleicher Ladung aus dem umgebenden flüssigen Medium ausgetauscht. Das stärker bindende Ion verdrängt das schwächer bindende Ion von den Bindungsstellen des Ionenaustauschharzes [56].

Wird also eine flüssige organische Probe, die geladene Antibiotika und Bakterien enthält, mit den Harzen in Kontakt gebracht, wird das Antibiotikum an das Harz adsorbiert, während die Bakterien wirksam das Harz passieren und sich nicht an das Harz binden [55]. Die Resine adsorbieren selektiv das Antibiotikum aus der Probe, während die enthaltenen Bakterien geschont werden. Der Grad, in dem Antibiotika aus der flüssigen Probe entfernt werden, hängt von der Art und Anzahl der Bindungsstellen des Ionenaustauschermaterials, dem Porendurchmesser und der Oberfläche des Harzes ab [55].

3.2 UHPLC – Bestimmung von Antibiotika- und Antimykotika-Rückständen

Die optimale Zeit, die das RESEP benötigt, um die Antibiotika und Antimykotika im Hornhautkulturmedium (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) zu entfernen oder zu binden, wurde mittels der UltiMate 3000 Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – UHPLC (High Performance Liquid Chromatography) ermittelt. Das Hornhautkulturmedium enthält 2 % australisches fötales Kälberserum, Penicillin G 62,5 µg/ml, Streptomycin 100 µg/ml und Amphotericin B 2,5 µg/ml in modifiziertem Eagle's Medium (MEM) mit Earl's Salt. Der Gehalt an Penicillin und Streptomycin im Hornhautkulturmedium vor und nach der RESEP-Behandlung wurde an der Säule UHPLC Poroshell 120 SB-C18 2,7 µm, 4,6 × 100 mm und Amphotericin B an der Säule UHPLC ULTRA C18 3 µm 150 × 2,1 mm gemessen. Dazu wurden in Triplicat-Messungen 9 ml Hornhautkulturmedium nach 10, 20, 30 und 60 Minuten mit RESEP unter kontinuierlichem Rühren bei Raumtemperatur inkubiert und unmittelbar danach in das UHPLC-System injiziert. Der Gehalt vor der RESEP-Behandlung und 20 Minuten danach wurde an drei verschiedenen Hornhautkulturmedium -Chargen bestimmt.

3.3 Blutkulturautomat BD BACTEC™ FX

Das Funktionsprinzip des Blutkulturautomaten BD BACTEC™ FX basiert auf der Fluoreszenztechnologie. Sind in der Probe lebensfähige Mikroorganismen enthalten, so verstoffwechseln sie im Nährmedium enthaltene Nährstoffe und bilden dabei CO₂, was in das Medium freigesetzt wird. Ein Farbstoffsensor am Boden der Blutkulturflaschen reagiert mit dem freigesetzten CO₂ und moduliert die Lichtmenge, die vom Fluoreszenzmaterial im Sensor absorbiert wird. Fotodetektoren in den jeweiligen Messkammern des Gerätes messen die Fluoreszenzkonzentration, welche der freigesetzten Menge an CO₂ der Organismen entspricht. Anschließend wird der Messwert anhand vorprogrammierter „Positiv“-Algorithmen im Gerät ausgewertet [58, 59]. In Abbildung 3 wird das Funktionsprinzip schematisch dargestellt.

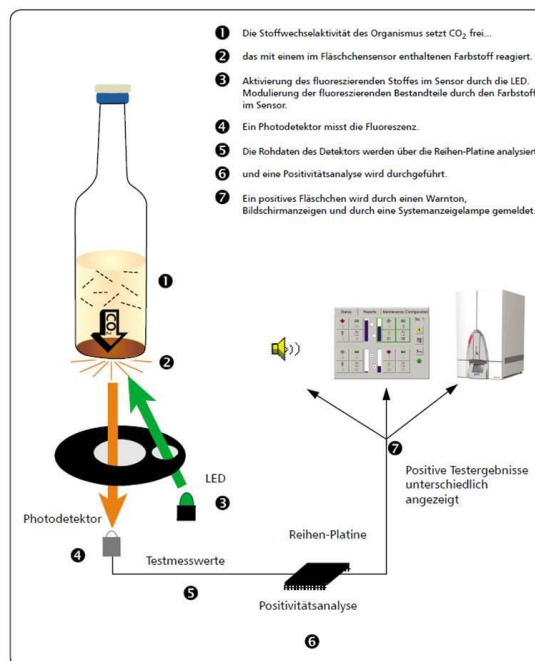


Abbildung 3: Funktionsprinzip BACTEC™ FX

(Bildquelle: Dr. Bettina Kuppelwieser, Sektion für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, Medizinische Universität Innsbruck)

3.4 BD BACTEC™ Blutkulturmedien

Für die Kultivierung und Identifizierung aerober und anaerober Mikroorganismen aus antibiotikahaltigem Hornhautkulturmedium wurde folgendes Blutkulturpaar verwendet:

BD BACTEC™ Plus – Aerobic / F

BD BACTEC™ Plus – Anaerobic / F

Die BD BACTEC™-Plus-Blutkulturflaschen enthalten ebenfalls Kunstharze (Resine) zur Minimierung der Antibiotika-Aktivität im Medium. Die Konzentration einer großen Bandbreite der am meisten verabreichten Antibiotika wird nach dem Ionenaustauschprinzip, wie im Kapitel 6.1 beschrieben, verringert. Ein wichtiger Hinweis ist jedoch, dass nicht alle antimikrobiellen Substanzen gleich effektiv neutralisiert werden. Einige werden kaum oder gar nicht gebunden, z. B. Ceftazidim und Cefotaxim [58].

3.4.1 BD BACTEC™ Plus – Aerobic / F

Die BD BACTEC™ Plus – Aerobic / F Blutkulturflaschen beinhalten angereicherte Casein-Soja-Pepton-Brühe (Aerobe Atmosphäre angereichert mit CO₂) zur Anzucht aerober Bakterien, Hefe- und Sprosspilzen [59].

3.4.2 BD BACTEC™ Plus – Anaerobic / F

Die BD BACTEC™ Plus – Anaerobic / F Blutkulturflaschen beinhalten vorreduzierte angereicherte Casein-Soja-Pepton-Brühe (Anaerobe Atmosphäre angereichert mit CO₂) zur Anzucht obligat und fakultativ anaerober Bakterien [59].

3.5 Vorbereitung von Mikroorganismen und Inokula

Für die experimentelle Studie wurden gemäß Ph. Eur., Kapitel 2.6.27 „Mikrobiologische Kontrolle zellulärer Produkte“, die unter „Growth Promotion Test“ aufgeführten Mikroorganismen *Staphylococcus aureus* (SA), *Bacillus subtilis* (BS), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Candida albicans* (CA), *Aspergillus brasiliensis* (AB) und *Clostridium sporogenes* (CS) verwendet. Zusätzlich wurden in diese Untersuchungen *Staphylococcus epidermidis* (SE) und *Enterobacter cloacae* (EC) miteinbezogen. Die Keime wurden kommerziell erworben oder vom Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH bezogen. Die verwendeten mikrobiologischen Kulturnährmedien BD BACTEC™ Plus aerob/F und BD BACTEC™ Plus anaerob/F stimmen in ihrer grundsätzlichen Zusammensetzung mit den Vorgaben nach Ph. Eur., Kapitel 2.6.1 „Prüfung auf Sterilität“, überein. Das Ph. Eur., Kapitel 2.6.27, beschreibt ausführlich die Vorgehensweise einer Methodvalidierung (Matrixvalidierung). Zur Herstellung der Inokula wurden lyophilisierte Pellets (*Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) und frische Kolonien, die auf Blutagarplatten (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter cloacae*) isoliert wurden, gemäß den Anweisungen des Herstellers unter optimalen Wachstumsbedingungen subkultiviert und ihre Konzentration mittels McFarland-Methode gemessen. Serielle Verdünnungen wurden durchgeführt, um eine Inokulumskonzentration von 10 bis 100 koloniebildenden Einheiten (KBE) in 1 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) (OXOID Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland) zu erhalten. Nur für *Aspergillus brasiliensis* wurde das Inokulum ohne eine vorherige Subkultur direkt aus dem lyophilisierten Pellet hergestellt. Die Inokula wurden dann auf Columbiablut-Agarplatten (OXOID Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland) ausplattiert, bei 35 °C inkubiert und die KBEs nach 48 Stunden gezählt, um die tatsächliche mikrobielle Konzentration jedes Inokulums zu bestimmen. Von jedem Bakterienstamm wurden 10 bis 100 KBE in 9 ml Hornhautkulturmedium geimpft. Jeder Ansatz, Hornhautkulturmedium, Positiv- und Negativkontrollen, wurden als Triplikat gemessen und in mindestens drei verschiedenen Experimenten wiederholt (n = 9).

Die Versuche wurden in zwei Gruppen aufgeteilt:

Gruppe A: Hier wurde das gespikete Hornhautkulturmedium vorsichtig mit RESEP aufgenommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einen Rollenschüttler gestellt und durch rotierende Bewegung durchmischt. Nach der RESEP-Behandlung wurden die Proben mit *Clostridium sporogenes* in BD BAC-

TEC™ Plus anaerob/F Blutkulturflaschen inokuliert. Proben mit *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* und *Aspergillus brasiliensis* wurden in BD BACTEC™ Plus aerob/F Blutkulturflaschen beimpft. Proben mit *Staphylococcus aureus* wurden sowohl in BD BACTEC™ Plus aerob/F als auch in BD BACTEC™ Plus anaerob/F überführt. Die Blutkulturflaschen wurden im Anschluss im Blutkulturautomat BD BACTEC™ 9120-FX bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für 14 Tage oder bis ein positives Ergebnis detektiert wurde, inkubiert. Jede positive Flasche wurde zunächst auf Reinkultur mittels Subkultivierung auf Columbiablut-Agarplatten überprüft und anschließend wurde eine Keimidentifizierung mittels morphologischer Merkmale und Massenspektrometrie (MALDI-TOF MD, Bruker) durchgeführt.

Gruppe B: Parallel wurden in Gruppe B die gespikten Hornhautkultur-Proben direkt, ohne vorherige RESEP-Behandlung, entsprechend in die jeweiligen BD BACTEC™ Plus Blutkulturflaschen überführt und gleichermaßen im Blutkulturautomaten bebrütet.

Positivkontrollen (Wachstumskontrollen) wurden parallel mitgeführt, dabei wurden 10 bis 100 KBE/1 ml Trypton-Soja-Bouillon direkt in die jeweiligen Blutkulturflaschen inokuliert. Bei den Negativkontrollen wurden 9 ml Trypton-Soja-Bouillon mit und ohne RESEP-Behandlung in aeroben und anaeroben Blutkulturflaschen überführt. Alle Flaschen wurden in dem Blutkulturautomat BD BACTEC™ 9120-FX analog inkubiert. In Abbildung 4 wird der Versuchsaufbau dargestellt.

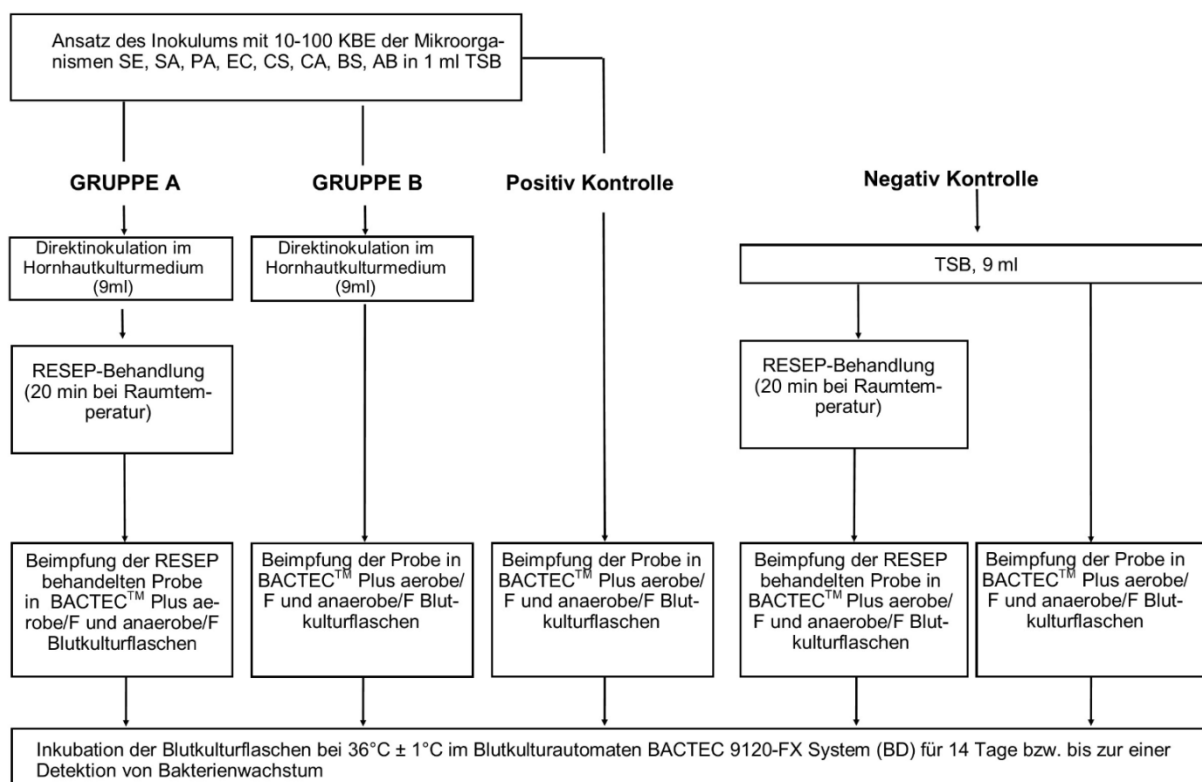


Abbildung 4: Versuchsaufbau der Studie. *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Enterobacter cloacae* (EC), *Clostridium sporogenes* (CS), *Candida albicans* (CA), *Bacillus subtilis* (BS) und *Aspergillus brasiliensis* (AB)

3.6 Datenanalyse und Statistik

Die gewonnenen Daten wurden statistisch ausgewertet und analysiert. Für jede Gruppe und jeden getesteten Keim wurden durch ein mit dem BoxPlotR-Web-Tool (<http://boxplot.tyerslab.com>) erzeugtes Box-Plot-Diagramm der Prozentsatz an positiv detektierten Proben, die mittlere Zeit bis zur Detektion und Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Der exakte Fisher-Test wurde verwendet, um für jeden Mikroorganismus die Anzahl an positiv detektierten Proben zwischen den Positivkontrollen und den Gruppen A und B in einer 2x2-Kontingenztafel zu vergleichen. Mit Kruskal-Wallis' einfaktorieller Rangvarianzanalyse wurden die unterschiedlichen Detektionszeiten zwischen den Gruppen und anschließend mit Dunn's Post-hoc-Test die nichtparametrischen paarweisen multiplen Vergleiche in separaten Gruppen analysiert. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Sensitivität in Gruppe A und B wurde als richtig-positives (TP) Ergebnis geteilt durch das TP plus falsch-negatives (FN)-Ergebnis $[TP / (TP + FN)]$ berechnet und als Prozentsatz angegeben. Die Spezifität wurde als richtig-negatives (TN) Ergebnis geteilt durch TN plus falsch-positives (FP) Ergebnis $[TN / (TN+FP)]$ berechnet und als Prozentsatz angegeben.

Die UHPLC-Peakflächen für Penicillin G, Streptomycinsulfat und Amphotericin B wurden mit der Standardfläche und der mittleren Konzentration verglichen. Standardabweichung und Prozentsatz des Anfangsgehalts wurden berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Entfernung der Antibiotika im Hornhautkulturmedium

Der mittlere Gehalt an Streptomycinsulfat, Penicillin G und Amphotericin B im Hornhautkulturmedium wird nach verschiedenen Zeitintervallen der RESEP-Behandlung in Tabelle 1 dargestellt. Nach 10 Minuten mit RESEP konnten mehr als 99,9 % der Initialkonzentration an Streptomycinsulfat und zu 100 % das Amphotericin B vom Hornhautkulturmedium entfernt werden. Nach 20 Minuten RESEP-Behandlung wurden 100 % Amphotericin B, 100 % Streptomycin-Sulfat und 99,7 % des Penicillins G entfernt. 99,9 % Penicillin G wurden nach 60 Minuten erreicht.

Tabelle 1: Antibiotikakonzentration im Hornhautkulturmedium ($\mu\text{g} / \text{ml}$) nach verschiedenen RESEP-Behandlungsintervallen

Mittlere Antibiotikakonzentration im Hornhautkulturmedium ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
Zeit der RESEP-Behandlung	Streptomycinsulfat	Penicillin G	Amphotericin B
keine Behandlung (n = 9)	119,18 \pm 3,14	51,15 \pm 8,41	0,11 \pm 0,08
10 min (n = 3)	0,11 \pm 0,00	0,30 \pm 0,04	0,00 \pm 0,00
20 min (n = 9)	0,00 \pm 0,00	0,16 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00
30 min (n = 6)	nicht bestimmt	0,08 \pm 0,06	nicht bestimmt
60 min (n = 6)	nicht bestimmt	0,05 \pm 0,02	nicht bestimmt

4.2 Nachweis des Wachstums der Mikroorganismen mit BD BACTEC™ FX

In Tabelle 2 ist der Prozentsatz an positiven Proben pro Mikroorganismus und Gruppe, welche mittels BD BATEC™ 9120-FX Blutkulturautomaten im gespickten Hornhautkulturmedium detektiert wurden, dargestellt. In RESEP-behandelten Proben der Gruppe A (n = 99) sowie bei der Positivkontrolle konnten alle Mikroorganismen bei jeder Messung zu 100,00 % nachgewiesen werden. Nach dem exakten Fisher-Test sind beide Gruppen statistisch äquivalent. Anders in Gruppe B, hier wurde eine Gesamtsensitivität von 67,9 % (n = 96) verzeichnet. Einen 100,00-prozentigen Nachweis von mikrobiologischem Wachstum konnte nur für *Pseudomonas aeruginosa* (n = 12), *Clostridium sporogenes* (n = 9) und *Aspergillus brasiliensis* (n = 9) erbracht werden. Ein signifikanter prozentualer Anteil an falsch-negative Ergebnissen ($p < 0,05$, exakter Fisher-Test zwischen der Gruppe B und den Positivkontrollen) zeigt *Staphylococcus aureus* (33,33 %, n = 12 in BD BACTEC™ Plus areob/F- und 83,33 % in BD BACTEC™ Plus anaerob/F Blutkulturflaschen), *Candida albicans* (50,00 %, n = 12) und *Bacillus subtilis* (16,67 %, n = 12). Alle Negativkontrollproben zeigen kein Wachstum nach 14-tägiger Bebrütung im BD BACTEC-Blutkulturautomaten.

Tabelle 2: Prozentsatz positiv detektierter, mittels BACTEC 9120-FX von der Gesamtanzahl beimpfter Proben pro Mikroorganismus und Gruppe

	Positive Proben detektiert von BD BACTEC 9120-FX System		
	Gruppe A	Gruppe B	Positivkontrolle
<i>S. epidermidis</i> , ATCC® 12228™	100,00 % (n = 9)	88,89 % (n = 9)	100,00 % (n = 9)
<i>S. aureus</i> , ATCC® 6538™ (BACTEC™ Plus Anaerobic/F)	100,00 % (n = 12)	83,33 % (n = 12)	100,00 % (n = 10)
<i>S. aureus</i> , ATCC® 6538™ (BACTEC™ Plus Aerobic/F)	100,00 % (n = 12)	33,33 % (n = 12)	100,00 % (n = 10)
<i>P. aeruginosa</i> , ATCC® 9027™	100,00 % (n = 12)	100,00 % (n = 12)	100,00 % (n = 10)
<i>E. cloacae</i> , MV 20259	100,00 % (n = 9)	55,56 % (n = 9)	100,00 % (n = 9)
<i>C. sporogenes</i> , ATCC ® 19404™	100,00 % (n = 9)	100,00 % (n = 9)	100,00 % (n = 9)
<i>C. albicans</i> , ATCC® 90028™	100,00 % (n = 12)	50,00 % (n = 12)	100,00 % (n = 10)
<i>B. subtilis</i> , ATCC® 6633™	100,00 % (n = 15)	16,67 % (n = 12)	100,00 % (n = 11)
<i>A. Brasiliensis</i> , ATCC® 16404™	100,00 % (n = 9)	100,00 % (n = 9)	100,00 % (n = 9)

4.3 Nachweiszeit bis zum mikrobiellen Wachstum

Die Ergebnisse der Detektionszeit (Time to Detection – TTD) von mikrobiellem Wachstum pro Mikroorganismus und Gruppe wird in Abbildung 5 dargestellt. Vergleicht man Gruppe A (mit RESEP-Behandlung) und Gruppe B (ohne RESEP-Behandlung), ist nach Kruskal-Wallis und Dunn's Post-hoc-Test für

Staphylococcus epidermidis, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Clostridium sporogenes* in Gruppe A die Zeit bis zum Nachweis des mikrobiellen Wachstums signifikant kürzer ($p < 0,01$) als in Gruppe B, während es für *Aspergillus brasiliensis* keinen statistischen Unterschied zwischen den Gruppen ergab. Die Ergebnisse für *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* und *Bacillus subtilis* wurden aufgrund unterschiedlicher Probengröße größer 50 % aus der statistischen Analyse ausgeschlossen. Vergleicht man die Detektionszeit der Gruppe A mit der Positivkontrolle, so gibt es keinen statistisch relevanten Unterschied. Anders in Gruppe B, hier finden wir für alle Stämme einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Positivkontrollen mit Ausnahme von *Aspergillus brasiliensis* ($p < 0,01$).

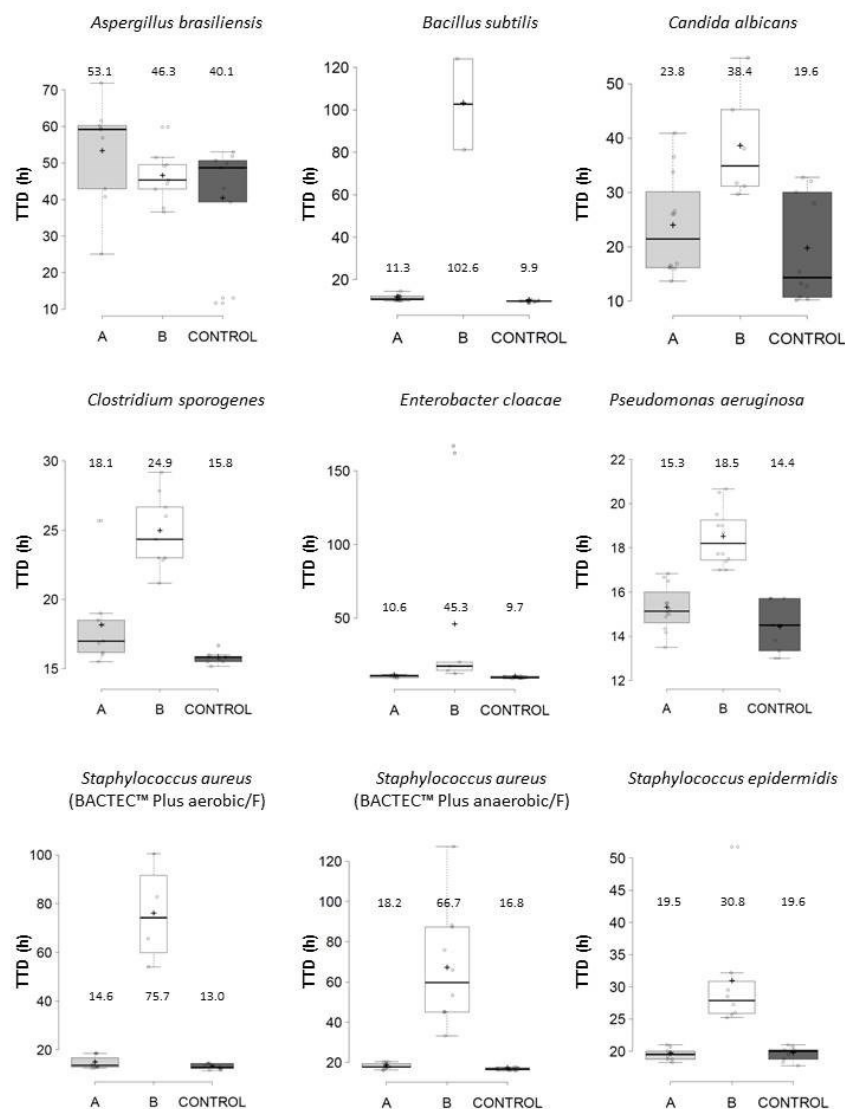


Abbildung 5: Box-Plot-Diagramm zur Bestimmung der Detektionszeit (TTD) mittels BD BACTEC™ 9120-FX für Gruppe A, Gruppe B und Positivkontrolle. Die angegebenen Werte entsprechen der mittleren Detektionszeit.

4.4 Sensitivität und Spezifität

Die durchschnittliche Sensitivität in Gruppe A betrug 100,0 % (n = 99). Im Gegensatz dazu fanden wir in Gruppe B eine geringere Sensitivität von 67,9 % ± 11,0 % (n = 96). Die Spezifität betrug in beiden Gruppen 100,0 % (siehe Tabelle 3).

5 Diskussion

Mehrere Validierungsstudien zur Steriltestung von Produkten aus Gewebe- und Zellzubereitungen mittels automatisierter Blutkultursysteme einschließlich resinhaltiger Blutkulturflaschen wurden veröffentlicht, ohne das Erfordernis, Antimikrobiotika aus den Proben zu entfernen [60,61,62,63]. Die Wirksamkeit der Elimination hängt jedoch von der Art und Konzentration der verwendeten Antimikrobiotika, sowie von den verwendeten Harzen ab. Spaargen *et al.* konnten zeigen, dass die Aktivität allgemein verwendeter Antibiotika innerhalb von 2 Stunden Inkubation in resinhaltigen BD BACTEC™-Plus-Flaschen um 80 bis 90 % abnahm [64]. Die Antibiotikakonzentration wurde so gewählt, dass sie klinisch erreichbare Werte widerspiegelt. Andere Autoren [65] zeigten, dass einige der untersuchten Antibiotika in BD BACTEC™-Plus-Flaschen nur teilweise oder gar nicht neutralisiert waren. Schroeter *et al.* wiesen relevante Einschränkungen für die Sterilitätsprüfung mittels Blutkulturflaschen von Hornhautkulturmedien mit hoher Antimikrobiotikakonzentration nach [50].

Um eine unvollständige Neutralisation von Antimikrobiotika durch BD BACTEC™-Plus-Flaschen zu verhindern, wurde in der vorliegenden Studie die zusätzliche Behandlung des Hornhautkulturmediums mit RESEP und dessen Effekt auf die Sensitivität des mikrobiellen Wachstumsnachweises untersucht.

In Gruppe A mit zusätzlicher Resinbehandlung konnte eine Sensitivität von 100 % ohne einen statistisch signifikanten Unterschied in der Nachweiszeit im Vergleich zu den Positivkontrollen nachgewiesen werden. In Gruppe B dagegen, in der das mit Mikroorganismen gespickte Hornhautkulturmedium direkt in die Blutkulturflaschen inokuliert wurde, betrug die Sensitivität 67 % mit einer signifikanten Verzögerung der Nachweiszeit für alle getesteten Mikroorganismen mit Ausnahme von *Aspergillus brasiliensis*.

Im Einklang mit anderen Ergebnissen von RESEP-Studien konnte eine schnelle und hohe Adsorption der Antimikrobiotika Penicillin G, Streptomycin und Amphotericin B innerhalb von 20 Minuten erzielt werden [51]. Nach 20 Minuten RESEP-Behandlung war eine vollständige Eliminierung von Streptomycin und Amphotericin B bei lediglich einigen Restspuren von Penicillin G mittels Ultra-Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie nachweisbar. Als optimale Behandlung wurde die 20-minütige RESEP-Inkubation bei Raumtemperatur sowohl für die Elimination antimikrobieller Substanzen aus dem Hornhautkulturmedium als auch für die Kompatibilität mit dem Routineverfahren in der Hornhautbank bestimmt. Aus früheren Untersuchungen von Lindsey und Riley geht hervor, dass Resine Bakterien weder zurückhalten oder inhibieren noch abtöten, und so konnte auch in dieser Studie durch die RESEP-Behandlung keine hemmende Wirkung auf das mikrobielle Wachstum nachgewiesen werden [66].

Schroeter *et al.* wiesen *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* mit 10 ml des gleichen Hornhautkulturmediums in BD BACTEC™-Plus/F-Blutkulturflaschen zuverlässig nach. *Staphylococcus aureus* konnte nur in BD BACTEC™ Plus anaerob/F-Blutkulturflaschen nachgewiesen werden und *Bacillus subtilis* in 6 von 8 Ansätzen [50]. Die höhere Nachweisrate in deren Studie im Vergleich zu Gruppe B könnte darauf zurückzuführen sein, dass die

Keime direkt in die Blutkulturflaschen inokuliert wurden, nachdem das Medium bereits in die Flaschen gegeben und darüber eine Verdünnung erreicht worden war. In der vorliegenden Studie wurden die Mikroorganismen direkt in das Hornhautkulturmedium geimpft, bevor sie in die Blutkulturflaschen überführten, um ein kontaminiertes Hornhautkulturmedium zu simulieren.

Thomasen *et al.* haben ein Protokoll unter Verwendung des automatisierten Blutkultursystems Bac T/Alert mit zusätzlicher Gabe von Penicillinase evaluiert. Durch die Zugabe der Penicillinase wird die Wirksamkeit des Penicillins im Hornhautkulturmedium enzymatisch reduziert [67]. Sie fanden keinen signifikanten Unterschied der Detektionszeiten zwischen den gespikten Proben und den Positivkontrollen mit Ausnahme von *Bacillus subtilis* [67]. Im Gegensatz zu unserer Methode wurden in dem Protokoll von Thomasen *et al.* 5 ml Hornhautkulturmedium verwendet und die Testkeime erst hinzugefügt, nachdem das Hornhautkulturmedium für eine Stunde mit der Penicillinase vorinkubiert worden war [67]. Ein Nachteil dieses Protokolls ist, dass lediglich die Inaktivierung des Penicillins erfolgt und das Enzym auf alle weiteren Antibiotika und Antimykotika keine Wirkung hat. Aufgrund dessen und angesichts der Ergebnisse für *Bacillus subtilis* kann davon ausgegangen werden, dass eine zusätzliche Resinbehandlung des Hornhautkulturmediums, anders als ein enzymatischer Abbau, die Sensitivität deutlich erhöht. Um einen besseren Vergleich herstellen zu können, wurden die gleichen resinhaltigen Blutkulturflaschen in Gruppe A und Gruppe B verwendet. Daher kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Resine in den Blutkulturflaschen für die Sensitivität, die mit der RESEP-Behandlung erreicht wurde, notwendig sind. Zusätzliche Tests mit Blutkulturflaschen ohne Resine und spezifische klinische mikrobielle Isolate sollten durchgeführt werden, um die Empfindlichkeit des mikrobiologischen Testsystems unter Verwendung von RESEP weiter zu charakterisieren. Mistò *et al.* berichten über die Verwendung von RESEP zur Entfernung von Antimikrobiotika aus Kultivierungs- und Transportmedien für Augenhornhäute (CARRY-C und TISSUE-C, AL.CHI.MI.ASrl), bevor das Mikrobewachstum innerhalb von 48 Stunden von einem weiteren Testsystem, einem automatisierten Lichtstreakultursystem (HB und L, Alifax, Polverara, Italien), abgelesen wird. Sie zeigten auch, dass die Empfindlichkeit auf diese Weise auf 100 % erhöht werden konnte [52]. In der prospektiven Studie von Vignola *et al.* wurden drei Proben nur dann als kontaminiert befundet, wenn das Hornhautkulturmedium (TISSUE-C, AL.CHI.MI.ASrl) mit RESEP behandelt wurde [45]. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, die derzeit verwendete mikrobiologische Testmethode neu zu validieren um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden.

Aus den vorgelegten Daten kann abgeleitet werden, dass die Probenbehandlung des Hornhautkulturmediums mit RESEP die Empfindlichkeit der mikrobiologischen Tests mit BD BACTEC™-Plus-Blutkulturflaschen erhöht und somit antibiotikabedingte, falsche-negative Ergebnissen ausgeschlossen werden können. Das Risiko über die Spenderhornhaut erworbenen Endophthalmitis oder Keratitis kann so auf ein Minimum reduziert werden.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Studie konnte die neue innovative Methode zur Eliminierung von Antibiotika aus Proben für mikrobiologische Tests mittels RESEP gemäß Europäischem Arzneibuch (Ph. Eur.), Kapitel 2.6.1 und Kapitel 2.6.27, erfolgreich validiert werden. In RESEP-behandelten Proben (n = 99) sowie bei der Positivkontrolle konnten alle Mikroorganismen bei jeder Messung zu 100,00 % nachgewiesen werden. Anders bei den nicht behandelten Proben, hier wurde eine Gesamtsensitivität von 67,9 % (n = 96)

verzeichnet. Dabei zeigen *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* und *Bacillus subtilis* einen signifikanten prozentualen Anteil an falsch-negativen Ergebnissen ($p < 0,05$). *Staphylococcus aureus* wurde bei 4 von 12 Proben in den aeroben BD BACTEC™-Plus/F-Blutkulturflaschen und bei 10 von 12 Proben in den anaeroben BD BACTEC™-Plus/F-Blutkulturflaschen nachgewiesen. *Candida albicans* wurde bei 6 von 12 Proben und *Bacillus subtilis* bei nur 2 von 12 Proben detektiert. Dieses Ergebnis ist insofern wichtig, da die bakterielle Endophthalmitis und Keratitis überwiegend durch Staphylokokken ausgelöst werden und *Candida albicans* als der am häufigsten nachgewiesene Keim in der Literatur beschrieben wird, der in Verbindung mit einer über die Spenderhornhaut erworbene Endophthalmitis und/oder Keratitis steht.

Die fast hundertprozentige Eliminierung der im Hornhautkulturmedium enthaltenen Antibiotika Penicillin und Streptomycin und des Antimykotikums Amphetericin B durch die RESEP-Behandlung führt zum Ausschluss von falsch-negativen Ergebnissen. Das Risiko, eine Endophthalmitis oder Keratitis über die Spenderhornhaut zu erwerben, kann dadurch auf ein Minimum reduziert werden. Das vorgestellte Verfahren zur mikrobiologischen Untersuchung von Hornhautkulturmedium unter Verwendung einer zusätzlichen RESEP-Behandlung kann leicht in die Routine einer Augenhornhautbank implementiert werden. Um die Empfindlichkeit des mikrobiologischen Testsystems unter Verwendung von RESEP weiter zu charakterisieren und um eine größere Sicherheit gewährleisten zu können, sollten zusätzliche Tests mit weiteren spezifischen klinisch-relevanten mikrobiellen Isolaten durchgeführt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Bowling B. KANSKIs Klinische Ophthalmologie. Ein systematischer Ansatz. 8. Auflage. Elsevier GmbH Deutschland, 2017.
2. Grehn F. Augenheilkunde. 31. überarbeitete Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012.
3. Lang GK. Augenheilkunde. 6. überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York 2015.
4. Doughty MJ, Zaman ML. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Survey of Ophthalmology* 2000 Mar–Apr;44(5):367–408. doi: 10.1016/s0039-6257(00)00110-7.
5. Lagali N. Corneal stromal regeneration: current status and future therapeutic potential. *Curr Eye Res* 2019 Sep 20:1–13. doi: 10.1080/02713683.2019.1663874.
6. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* 2018 Feb;66(2):190–194. doi:10.4103/ij.o.IJO_646_17.
7. Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the cornea: structure, function, and development. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;134:7 – 23. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.04.001
8. Williams KK, Noe RL, Grossniklaus HE, Drews-Botsch C, Edelhauser HF. Correlation of histologic corneal endothelial cell counts with specular microscopic cell density. *Arch Ophthalmol* 1992;110(8):1146–1149. doi:10.1001/archophth.1992.01080200126039.
9. Galgauskas S, Norvydaitė D, Krasauskaitė D, Stech S, Ašoklis RS. Age-related changes in corneal thickness and endothelial characteristics. *Clin Interv Aging* 2013;8:1445–50. doi: 10.2147/CIA.S51693.
10. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997 Mar;38(3):779–82.
11. Boynton GE, Woodward MA. Evolving techniques in corneal transplantation. *Curr Surg Rep* 2015 February 1;3(2). doi:10.1007/s40137-014-0079-5.
12. Lambert NG, Chamberlain WD. The structure and evolution of eye banking: a review on eye banks' historical, present, and future contribution to corneal transplantation. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* 2017 June 6;5:23–40. doi: <https://doi.org/10.2147/BSAM.S114197>.
13. Flockerzi E, Maier P, Böhringer D, Reinshagen H, Kruse F, Cursiefen C, Reinhard T, Geerling G, Torun N, Seitz B. Trends in corneal transplantation from 2001 to 2016 in Germany: a report of the DOG-section cornea and its keratoplasty registry. *Am J Ophthalmology* 2018 Apr;188:91–98. doi: 10.1016/j.ajo.2018.01.018.
14. DSO-Jahresbericht 2016. Zahl der Organspenden bleibt niedrig. KV-Blatt 04.2017.
15. Zirm, E. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik. *Graefes Arhiv für Ophthalmologie* 1906; 64:580–593. doi:10.1007/BF01949227.
16. Maier P, Reinhard T. Keratoplastik: Lamellieren oder perforieren? Teil 2: Lamelläre Keratoplastik. *Der Ophthalmologe* 2009 July;106:649–663. doi: 10.1007/s00347-009-1943-z.
17. Cursiefen C, Kruse FE. Posteriore lamelläre Keratoplastik (DSAEK). *Der Ophthalmologe* 2009 Oct; 106(10):939–52. Doi: 10.1007/s00347-009-2024-z.
18. Deng SX, Lee WB, Hammersmith KM, Kuo AN, Li JY, Shen JF, Weikert MP, Shtein RM. Descemet membrane endothelial keratoplasty: safety and outcomes: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2018 Feb;125(2):295–310. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.08.015.
19. Dirisamer M, Ham L, Dapena I, Moutsouris K, Droutsas K, Dijk K, Frank EL, Oellerich S, Melles GRJ. Efficacy of Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Clinical Outcome of 200 Consecutive Cases After a Learning Curve of 25 Cases. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(11):1435–1443. doi:10.1001/archophtholmol.2011.195

20. Anshu A, Price MO, Price FW Jr. Risk of corneal transplant rejection significantly reduced with descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Ophthalmology* 2012 MAR; 119(3):536–540. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.09.019.
21. Paton D, The founder of the first eye bank: R. Townley Paton, MD. *Journal of Refractive Surgery* 1991;7(2):190–195.
22. <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/gewebezubereitungen/augenhornhaut-cornea/augenhornhaut-node.html>.
23. Richtlinien zur Gewinnung von Spenderhornhäuten und zum Führen einer Augenhornhautbank. Erste Fortschreibung. *Dtsch Arztebl* 2018;115[6]:A 262. Doi: 10.3238/arztebl.2918.rl_augenhornhautbank_02.
24. Organspende – Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung. <https://www.organspende-info.de/gesetzliche-grundlagen/gesetze-und-richtlinien.html>.
25. EB. EU-Regelung erschwert Hornhauttransplantation. *Dtsch Arztebl* 2011;108(39):A-2000/B-1704/C-1688.
26. Dubord PJ, Evans GD, Macsai MS, Mannis MJ, Glasser DB, Strong DM, Noël L, Fehily D. Eye banking and corneal transplantation communicable adverse incidents: current status and project NOTIFY. *Cornea* 2013 Aug;32(8):1155–66. doi: 10.1097/ICO.0b013e31828f9d64.
27. European Centre for Disease Prevention and Control. Zika virus and safety of substances of human origin: a guide for preparedness activities in Europe – first update. Stockholm: ECDC; 2017.
28. Gruenert AK, Rosenbaum K, Geerling G, Fuchsluger TA. The influence of donor factors on corneal organ culture contamination. *Acta Ophthalmol* 2017 Nov;95(7):733–740. doi: 10.1111/aos.13402.
29. Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. *Int Ophthalmol* 2008 Jun;28(3):155–163. doi:10.1007/s10792-007-9086-1.
30. Armitage WJ. Preservation of Human Cornea. *Transfus Med Hemother* 2011 Apr;38(2):143–147. doi:10.1159/000326632.
31. Jeng BH. Preserving the cornea: corneal storage media. *Curr Opin Ophthalmol* 2006 Aug;17(4):332–7.
32. Redbrake C, Salla S, Frantz A, Reim M. Untersuchungen zum Energiestoffwechsel der humanen Hornhaut in verschiedenen Kultursystemen. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997;210(4):213–218. doi: 10.1055/s-2008-1035044.
33. Lau N, Sesé AH, Augustin VA, Kuit G, Wilkins MR, Tourtas T, Kruse FE, Højgaard-Olsen K, Manuel R, Armitage WJ, Larkin DF, Tuft SJ. Fungal infection after endothelial keratoplasty: association with hypothermic corneal storage. *Br J Ophthalmol* 2019;103:1487–1490.
34. Edelstein SL, DeMatteo J, Stoeger CG, Macsai MS, Wang CH. Report of the Eye Bank Association of America Medical Review Subcommittee on adverse reactions reported from 2007 to 2014. *Cornea* 2016 Jul;35(7):917–26. doi: 10.1097/ICO.0000000000000869.
35. European Eye Bank Association annual directory twenty-sixth edition January 2018. www.eeba.eu/files/00_98_2016Directory_26_Numbers2016_WJA_final.pdf.
36. Larsen PA, Lindstrom RL, Doughman DJ. Torulopsis glabrata endophthalmitis after keratoplasty with an organ-cultured cornea. *Arch Ophthalmol* 1978;96(6):1019–1022. doi:https://doi.org/10.1001/archophth.1978.03910050543010.
37. Sutphin JE, Pfaller MA, Hollis RJ, Wagoner MD. Donor-to-host transmission of *Candida albicans* after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 2002 Jul;134(1):120–1.
38. Kawakita T, Kawashima M, Shimazaki J. Management of *Candida albicans* donor-to-host transmission following penetrating keratoplasty. *Jpn J Ophthalmol* 2008 Mar–Apr;52(2):133–134. doi: 10.1007/s10384-007-0504-8.

39. Kitzmann AS, Wagoner MD, Syed NA, Goins KM. Donor-related Candida keratitis after Descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2009 Aug;28(7):825–8. doi: 10.1097/ICO.0b013e31819140c4.
40. Kitazawa K, Wakimasu K, Yoneda K, Iliakis B, Sotozono C, Kinoshita S. A case of fungal keratitis and endophthalmitis post penetrating keratoplasty resulting from fungal contamination of the donor cornea. *Am J Ophthalmol Case Rep* 2016 Dec 30;5:103–106. doi: 10.1016/j.ajoc.2016.12.015.
41. Fontana L, Moramarco A, Mandarà E, Russello G, Iovieno A. Interface infectious keratitis after anterior and posterior lamellar keratoplasty. Clinical features and treatment strategies. A review. *Br J Ophthalmol* 2019;103:307–314.
42. Hassan SS, Wilhelmus KR; Medical Review Subcommittee of the Eye Bank Association of America. Eye-banking risk factors for fungal endophthalmitis compared with bacterial endophthalmitis after corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 2005 Apr;139(4):685–90. doi:10.1016/j.ajo.2004.12.016.
43. Aldave AJ, DeMatteo J, Glasser DB, Tu EY, Iliakis B, Nordlund ML, Misko J, Verdier DD, Yu F. Report of the Eye Bank Association of America medical advisory board subcommittee on fungal infection after corneal transplantation. *Cornea* 2013 Feb;32(2):149–54. doi: 10.1097/ICO.0b013e31825e83bf.
44. Wilhelmus KR, Hassan SS. The prognostic role of donor corneoscleral rim cultures in corneal transplantation. *Ophthalmology* 2007 Mar;114(3):440–5. doi:10.1016/j.ophtha.2006.09.006.
45. Vignola R, Giurgola L, Gisoldi RAMC, Gaudio M, D'Amato Tóthová J, Pocobelli A. Monitoring the microbial contamination of donor cornea during all preservation phases. A prospective study in the Eye Bank of Rome. *Transpl Infect Dis* 2019 Apr;21(2):e13041. doi: 10.1111/tid.13041.
46. Röck D, Wude J, Bartz-Schmidt KU, Yoeruek E, Thaler S, Röck T. Factors influencing the contamination rate of human organ-cultured corneas. *Acta Ophthalmol* 2017 Dec;95(8):e706–e712. doi: 10.1111/aos.13375.
47. Brubaker S, Lotherington K, Zhao J, Hamilton B, Rockl G, Duong A, Garibaldi A, Simunovic N, Alsop D, Dao D, Bessemer R, Ayeni OR. Tissue recovery practices and bioburden a systematic review. *Cell Tissue Bank* 2016 Dec;17(4):561–571.
48. Pharmacopeia. European directorate for the quality of medicines. 8th edn, 2013.
49. Schroeter J, Pruss A, Schilling-Leiß D, Bekeredjian-Ding I. Gewebe und Zellen – Validierung mikrobiologischer Prüfmethode bei Verwendung antibiotikahaltiger Medien. *Transfusionsmedizin* 2018;8(03):170–172. Doi: 10.1055/a-0582-5405.
50. Schroeter J, Wilkemeyer I, Schiller RA, Pruss A. Validation of the Microbiological Testing of Tissue Preparations Using the BACTEC™ Blood Culture System. *Transfus Med Hemother* 2012 Dec;39(6):387–390. doi: 10.1159/000345812.
51. Buzzi M, Guarino A, Gatto C, Manara S, Dainese L, Polvani G, D'Amato Tóthová J. Residual antibiotics in decontaminated human cardiovascular tissues intended for transplantation and risk of falsely negative microbiological analyses. *PLoS One* 2014 Nov 14;9(11):e112679. doi: 10.1371/journal.pone.0112679.
52. Mistò R, Giurgola L, Pateri F, Frigerio E, Limongelli A, D'Amato Tóthová J. Method for sterility testing of corneal storage and transport media after removal of interfering antimicrobials prospective validation study in compliance with the European Pharmacopoeia. *BMJ Open Ophthalmol* 2017 Nov 15;2(1):e000093. doi: 10.1136/bmjophth-2017-000093.
53. <https://www.alchimiasrl.com/human-tissue-processing/microbiology/resep/>
54. Melnick JL, Wallis C. US Patent for Resin and method for removing antimicrobials from body fluids Patent (Patent # 4,145,304) 1979 - <https://patents.justia.com/patent/4145304>
55. Sahu P, Jaiswani R. Ion Exchange Resins: An approach for the Development of Advanced Materials with Industrial, Pharmaceutical and Clinical Applications. *IJARIT* 2018 V4I1-1279; Volume-4, Issue-1.

56. Engelhardt H. (1977) Ionenaustausch-Chromatographie. In: Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis, vol 14. Springer, Berlin, Heidelberg
57. Gain P, Thuret G, Chiquet C, Vautrin A, Carricajo A, Acquart S, Maugery J, Aubert G. Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. *Br J Ophthalmol* 2001 Oct;85(10):1158–62. doi: 10.1136/bjo.85.10.1158.
58. Kuppelwieser B, Orth-Höller D. hmm-newsletter 15 - Neues Blutkultur-System BD BACTEC™ FX. Sektion für Hygiene und medizinische Mikrobiologie. Medizinische Universität Innsbruck. 2018
59. Becton Dickinson GmbH, Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg, Germany. www.bd.com
60. Lysák D, Holubová M, Bergerová T, Vávrová M, Cangemi GC, Ciccocioppo R, Kruzliak P, Jindra P. Validation of shortened 2-day sterility testing of mesenchymal stem cell-based therapeutic preparation on an automated culture system. *Cell Tissue Bank* 2016 Mar;17(1):1–9. doi: 10.1007/s10561-015-9522-9. Epub 2015 Jul 5.
61. Suessner S, Hennerbichler S, Schreiberhuber S, Stuebl D, Gabriel C. Validation of an alternative microbiological method for tissue products. *Cell Tissue Bank* 2014 Jun;15(2):277–86. doi: 10.1007/s10561-014-9455-8.
62. Hocquet D, Sauget M, Roussel S, Malugani C, Pouthier F, Morel P, Gbaguidi-Haore H, Bertrand X, Grenouillet F. Validation of an automated blood culture system for sterility testing of cell therapy products. *Cytotherapy* 2014 May;16(5):692–8. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.09.005.
63. Akel S, Lorenz J, Regan D. Sterility testing of minimally manipulated cord blood products validation of growth-based automated culture systems. *Transfusion* 2013 Dec;53(12):3251–61. doi: 10.1111/trf.12229.
64. Spaargaren J, van Boven CP, Voorn GP. Effectiveness of resins in neutralizing antibiotic activities in bactec plus AerobicF culture medium. *J Clin Microbiol* 1998 Dec;36(12):3731–3.
65. Mitteregger D, Barousch W, Nehr M, Kundi M, Zeitlinger M, Makrithathis A, Hirschl AM. Neutralization of antimicrobial substances in new BacT/Alert FA and FN Plus blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2013 May;51(5):1534–1540. doi: 10.1128/JHORNHAUTKULTURMEDIUM.00103-13.
66. Lindsey NJ, Riely PE. In vitro antibiotic removal and bacterial recovery from blood with an antibiotic removal device. *J Clin Microbiol* 1981 Mar;13(3):503–7.
67. Thomasen H, Mosel F, Steuhl KP, Meller D. Evaluation of a new protocol for sterility controls of corneal culture medium. *Cell Tissue Bank* 2015 Sep;16(3):343–50. doi: 10.1007/s10561-014-9477-2.

Anteilserklärung

Publikation 1:

1. Zemra Skenderi, Laura Giurgola, Claudio Gatto, Jana D'Amato Tóthová , Axel Pruß, Jan Schroeter, Increased sensitivity of microbiological testing of cornea organ culture medium by additional resin treatment, BMJ Open Ophthalmology, 11. November 2018, 3:e000173. doi:10.1136/bmjophth-2018-000173

Beitrag im Einzelnen:

Die Grundidee sowie die Rahmenbedingungen des Projektes wurden von Prof. Axel Pruß entwickelt. Bei dieser Publikation stammten das Studiendesign und die entsprechende Planung von Zemra Skenderi zu 85%.

Die durchgeführten Experimente mittels Blutkulturautomat BD BACTEC™ FX wurden von Zemra Skenderi zu 100% selbstständig durchgeführt.

Die durchgeführten Experimente mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurden in Italien in der Abteilung „Research and Development“ (Alchilife Srl, Ponte San Nicolo, Italy) durchgeführt.

Die statistischen Daten wurden von Zemra Skenderi in Zusammenarbeit mit Laura Giurgola, Claudio Gatto und Jan Schroeter analysiert und ausgewertet.

Aus meiner statistischen Auswertung sind die Tabelle 2 und die Abbildung 1 in Zusammenarbeit mit Laura Giurgola entstanden.

Ich habe auf der Grundlage einer eigenen Literaturrecherche selbstständig eine erste Fassung des Manuskripts verfasst.

Unterschrift, Datum und Stempel

des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Zemra Skenderi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Resin-induzierte Sensitivitätserhöhung der mikrobiologischen Diagnostik in organkultivierten Augenhornhauttransplantaten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung).

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Curriculum Vitae

Dipl.-Ing. Zemra Skenderi

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Originalarbeit:

1. Skenderi Z, Giurgola L, Gatto C, D'Amato Tóthová J, Pruß A, Schroeter J. Increased sensitivity of microbiological testing of cornea organ culture medium by additional resin treatment. *BMJ Open Ophthalmology* 2018;3:e000173. doi:10.1136/bmjophth-2018-000173

Kongressbeiträge:

1. Skenderi Z, Pruß A, Schroeter J. Validation of sterility testing for cornea organ culture medium containing penicillinase and acetylcystein as additives. *Transfus Med Hemother* 2015;42(s1):56.
2. Skenderi Z, Giurgola L, Gatto C, D'Amato Tothova J, Pruß A, Schroeter J. RESEP a new medical device for microbiological testing of corneal organ culture medium. *Transfus Med Hemother* 2016;43(suppl 1): 53.
3. Skenderi Z, Schroeter J, Pruss A. Validation of microbiological testing of an antibiotic-containing medium for cardiovascular tissue preservation. 25th Congress of the European Association of Tissue Banks (EATB), 23.-25.11.2016, Hannover, Germany, p: 22 (#61).
4. Skenderi Z, Pruß A, Schroeter J. Antibiotics – a current problem of microbiological testing in tissue banking. *Transfus Med Hemother* 2017; 44 (suppl1): 46.
5. Schroeter J, Skenderi Z, Schulz E, Pruß A. Validation of microbiological testing in cardiovascular tissue. *Transfus Med Hemother* 2017; 44 (suppl1): 84.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Axel Pruß für die Übertragung des interessanten Projekts und für die Möglichkeit der Anfertigung der Dissertation in seinem Institut. Ebenso möchte ich mich sehr für die fachliche Unterstützung und die konstruktive Diskussion bedanken, die mir bei der Bearbeitung meines Themas geholfen haben.

Bei Dr. Jan Schroeter bedanke ich mich als Zweitbetreuer.

Besonderer Dank an Laura Giurgola und Jana D'Amato T'othová und der Abteilung für Research and Development der Archilfe Srl aus Italien, für die sehr gute Zusammenarbeit und sehr gute Kommunikation.

Danken möchte ich außerdem allen Mitarbeitern der Gewebebank und der Blutbank für die freundliche Atmosphäre und gute Zusammenarbeit. Besonderen Dank an Dr. Ina Wilkemeyer für die stete Hilfsbereitschaft bei allen auftretenden Problemen und für den moralischen Beistand.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die für mich immer ein Vorbild sein werden, selbst in den schwierigsten Zeiten nicht aufzugeben.

Meinen Lebenspartner Martin W. Maier möchte ich vom ganzen Herzen für seine unendliche Geduld und aufrichtige Unterstützung danken. Sowie meiner „Logical Family“, die mich stets aufgebaut hat.