

Aus dem
CharitéCentrum für Tumormedizin
Institut für Transfusionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. A. Salama

Habilitationsschrift

„Neue Aspekte zu Validität und Wertigkeit der postmortalen Testung relevanter Infektionsparameter bei Gewebespendern“

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Transfusionsmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinische Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. Ulrich Johannes Kalus
geboren am 23.11.1964 in Nordhorn

Eingereicht: Mai 2013

Dekanin: Univ.-Prof. Dr. med. A. Grütters-Kieslich

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. K. Püschel

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. T. Reinhard

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Historie.....	1
1.2. Ethische und rechtliche Aspekte	3
1.3. Infektionsrisiken bei der Übertragung von Blut und Geweben	5
1.4. Infektionsserologische Testung aus postmortalem Blut.....	11
1.5. NAT-Testung aus postmortalem Blut	13
1.6. Rechtliche Anforderungen an die Testung aus postmortalem Blut	14
2. Fragestellung	16
3. Eigene Arbeiten	17
3.1. Wilkemeyer I, Pruss A, Kalus U*, Schroeter J*. Comparative infectious serology testing of pre- and post-mortem blood samples from cornea donors. Cell Tissue Bank 2012;13: 447-52. (* shared senior authorship).....	18
3.2. Edler C, Wulff B, Schröder AS, Wilkemeyer I, Polywka S, Meyer T, Kalus U*, Pruss A*. A prospective time-course study on serological testing for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus with blood samples taken up to 48 h after death. J Med Microbiol 2011; 60: 920-6. (* shared senior authorship).....	26
3.3. Kalus U, Wilkemeyer I, Caspari G, Schroeter J, Pruss A. Validation of the Serological Testing for Anti-HIV-1/2, Anti-HCV, HBsAg, and Anti-HBc from Post-mortem Blood on the Siemens-BEP-III Automatic System. Transfus Med Hemother 2011; 38: 365-72.....	35
3.4. Kalus U, Wilkemeyer I, Pruss A, Caspari G. Validation of Serological Testing for Anti-Treponema pallidum from Postmortem Blood on the Siemens-BEP-III Automatic. Transfus Med Hemother 2013 (submitted)	45
3.5. Gubbe K, Scharnagl Y, Grosch S, Tonn T, Schmidt M, Hourfarb KM, Karl A, Seifried E, Wilkemeyer I, Kalus U. Validation of Virus NAT for HIV, HCV, HBV and HAV. Transfus Med Hemother 2012; 39: 381–5	53
4. Diskussion	59
5. Zusammenfassung	73
6. Literatur	75
7. Danksagung	83
Eidesstattliche Erklärung.....	84

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AMG	Arzneimittelgesetz
BÄK	Bundesärztekammer
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CJD	Creutzfeldt Jakob disease
CTS	Common Technical Specifications
DNA	deoxyribonucleic acid
EIA	Enzymimmunassay
GMP	Good Manufacturing Practice
HAV	Hepatitis A-Virus
HBc	Hepatitis B-core (Antigen)
HBsAg	Hepatitis B-surface-Antigen
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
PCR	polymerase chain reaction
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
RIA	Radioimmunassay
RIBA	Recombinant Immunoblot Assay
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid

1. Einleitung

Der Bedarf an Gewebetransplantationen in Deutschland und weltweit nimmt kontinuierlich zu. Gewebespenden können Lebend- aber auch Leichenspenden sein. Nach neuestem Kenntnisstand und Gesetzesvorgaben [28] ist es zulässig, die vorgeschriebene infektionsserologische Testung auch aus postmortalem (p.m.) Blut durchzuführen, wenn dieses innerhalb von 24 h nach Todeseintritt entnommen worden ist. Die verfügbaren infektionsserologischen Testmethoden bzw. Test-Assays sind jedoch für prämortales, nicht aber für postmortales Blut validiert und lizenziert, so dass eine Testung mit diesen Methoden bei p.m. Blut ohne vorherige Durchführung einer Validierung nicht möglich ist. In den folgenden Arbeiten haben wir umfangreiche Untersuchungen zur Validität unserer Testung auf Anti-HIV, Anti-HCV, Anti-HBc, HBsAg und Anti-Treponema pallidum mit postmortalen Blutproben durchgeführt und die Ergebnisse mit der Testung aus prämortalem Blut verglichen.

1.1. Historie

Ob beim Regenwurm oder Seestern - es gibt Ausnahmen dafür, dass sich Gliedmaßen oder Gewebe neu bilden können. Diese außergewöhnliche Regenerationsfähigkeit besitzen Organe oder Gewebe im Regelfall jedoch nicht. Ihr regeneratives Potenzial ist gering und beschränkt sich auf gewisse Reparaturprozesse. Obwohl sich Experten seit mehr als 20 Jahren damit beschäftigen, Gewebe im Labor zu züchten, gelingt ein Remodeling ex vivo bis heute nicht. Bisher entstanden mittels des Tissue Engineerings einfach aufgebaute, zumeist autologe Knorpelgewebe oder Hautzellverbände, die transplantiert werden können. Bei dem Versuch, komplexe Gewebestrukturen oder gar komplette Organe mittels Tissue Engineering zu entwickeln, handelt es sich jedoch (noch) um eine Zukunftsvision.

Die Transplantation von Organen und Gewebe bleibt daher ein unverzichtbarer integraler Bestandteil der modernen Medizin. Die Alternative, aus einem „Ersatzteillager“ fehlende Körperteile oder Organe zu ersetzen, geht auf die Antike zurück. Sagen, Mythen und Legenden, die bis in das Jahr 500 v. Chr. zurückverfolgt werden können, berichten von Organ- und Gewebeübertragungen. Die erste bildliche Darstellung einer solchen Operation stellt die beiden Schutzheiligen der Medizin, Cosmas und Damian dar, die im 3. Jahrhundert nach Christus einem weißen Missionar, der sein Bein verloren hatte, erfolgreich das Bein eines Schwarzen verpflanzt haben sollen. Im 17. Jahrhundert gab es Versuche, zerstörte menschliche Haut durch Xenotransplantate zu ersetzen. Aus dem 18. und dem späten 19. Jahrhundert gibt es Berichte über Transplantationen endokrinen Gewebes wie zum Beispiel der Ersatz von Schilddrüsengewebe durch den Berner Chirurgen Theodor Kocher im Jahr 1883. Die erste technisch gelungene Organtransplantation (Niere) gelang H. Ullmann in Wien 1902 bei ei-

nem Hund. Im Jahr 1906 konnte der österreichische Augenarzt Zirm die erste erfolgreiche Hornhauttransplantation durchführen [58]. Die Ergebnisse der in den folgenden Jahrzehnten zunehmenden humanen Organtransplantationen (Erstbeschreibung Niere 1950, Knochenmark 1958, Leber 1963, Herz 1967) waren jedoch durch die Abstoßungsreaktionen ernüchternd. Erst Fortschritte auf dem Gebiet der Immunsuppression führten zu wesentlichen Verbesserungen bei Organtransplantationen. Im Jahr 1976 wurde die immunsuppressive Wirkung von Ciclosporin A beschrieben. Dieses neue Medikament wurde bereits zwei Jahre später klinisch eingesetzt [5]. Mit der Optimierung der Immunsuppression nahm die Anzahl von Transplantationen deutlich zu. Insbesondere im Bereich der Corneatransplantation besteht in der Bundesrepublik Deutschland eine lange Warteliste. Von jährlich cirka 9.000 notwendigen Transplantationsgesuchen können nur etwa 5.000 berücksichtigt werden. Auch die Versorgung mit muskuloskelettalen Geweben (Knochen, Sehnen, Bänder), deren Bedarf bei etwa 40.000 Transplantationen pro Jahr liegt, lässt sich nicht gewährleisten. Die deutschen kardiovaskulären Gewebebanken liefern durchschnittlich 140 Aortenklappen- bzw. Pulmonalklappen-Allografts pro Jahr an die klinischen Anwender. Unter Hinzuziehung der jährlich importierten Klappen-Allografts dürfte der Bedarf bei etwa 220 Allografts pro Jahr liegen [68]. Der Bedarf nach allogenen Gefäßtransplantaten nimmt ebenfalls deutlich zu.

Das Gewebe von verstorbenen Spendern, so genannten Leichenspendern, wird in mehreren klinischen Fachgebieten verwendet. Das Spektrum umfasst muskuloskelettales Gewebe (Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder, Faszien) bei orthopädischen und unfallchirurgischen Eingriffen, Augenhornhaut (Cornea) bei ophthalmologischen Operationen und kardiovaskuläres Gewebe (Aorten- und Pulmonalklappe, Perikard, Venen, Arterien). Die wesentlichen Indikationen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Indikationen zur Transplantation von Cornea, kardiovaskulären und muskuloskelettalen Geweben

Transplantat	Indikationen
Cornea	<ul style="list-style-type: none"> • Perforierende oder lamelläre Keratoplastik bei HSV-Infektionen, Fuch-scher Dystrophie, Keratokonus
kardiovaskuläre Gewebe	<ul style="list-style-type: none"> • komplizierten Aortenklappenendokarditiden, Infektionen im Bereich der Aorta durch mykotische Aortenaneurysmen, Protheseninfektionen, Ross-Operation • Kinderkardiochirurgie: als klappentragende Gefäßabschnitte bei der Fal-lot'schen Tetralogie, in Fällen der vollständigen Pulmonalatresie zur Re-konstruktion des rechtsventrikulären Ausflusstraktes und bei der Korrektur des Double Outlet Right Ventricle (DORV).
Spongiose Knochengewebe	<ul style="list-style-type: none"> • TEP-Wechsel in Hüft- und Kniegelenk (Revisions-OP) • Verfüllung bei zystischen Tumoren und „tumor-like lesions“ • Posttraumatische Defekte • Ventrodorsale Fusion bei Spondylolisthesis • Umstellungsosteotomien der Tibia und des Femurs
Corticale Knochengewebe	<ul style="list-style-type: none"> • Wirbelkörperersatz nach Entzündung oder Tumor, Ersatz peripheren Kno-chens bei unterschiedlichen Defektsituationen • Stabilisierung bei schweren Skoliosen • Stabilisierung bei multiplen Femurfrakturen • Rekonstruktion von Knochendefekten, Knochendeckel bei Knochenzysten
Bandgewebe	<ul style="list-style-type: none"> • Ersatz bei Ruptur des Ligamentum patellae • Mediale Seitenbandinstabilität der Kniegelenkscapsel
Sehnengewebe	<ul style="list-style-type: none"> • Kreuzbandplastiken
Fasziengewebe	<ul style="list-style-type: none"> • Mediale Seitenbandinstabilität der Kniegelenkscapsel

Es muss jedoch betont werden, dass bei der Entnahme und Verwendung von Organen und Gewebe verstorbener Menschen ethische und rechtliche Aspekte, aber auch Infektionsrisi-ken immer berücksichtigt werden müssen. Die Komplexität dieser Prozesse wird nachfol-gend ausführlich dargestellt und diskutiert.

1.2. Ethische und rechtliche Aspekte

Aktuell werden ethische und medizinische Bedenken bei der Spende von Organen und Ge-webe in den Vordergrund gestellt. Zur Vermeidung einer Rechtsunsicherheit wurden Vorga-ben über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben im gesetzlich vorgeschrieben [Transplantationsgesetz - TPG]:

1. Die Möglichkeit einer Organentnahme darf die Bemühungen um das Leben des Spen-ders und seine Behandlung nicht behindern oder einschränken.
2. Der Hirntod des Spenders muss vor der Explantation zweifelsfrei feststehen.
3. Der Eingriff muss die Würde des Verstorbenen achten und darf die Empfindungen von Angehörigen nicht verletzen.
4. Die Organe müssen nach sachlich und ethisch vertretbaren Regeln verteilt werden. Eine sachgemäße Explantation von Geweben und Organen verletzt weder die Würde des Verstorbenen noch die Ruhe des Toten.

5. Ein kommerzieller Organhandel wird untersagt. Der Organhandel würde die Gefahr beinhalten, dass die Verteilung von Organen nicht mehr oder nicht mehr ausschließlich nach medizinischen, sondern nach finanziellen Kriterien erfolgte. Damit würden zum einen mittellose Kranke gegenüber Wohlhabenden benachteiligt. Es wäre die Gleichheit in der medizinischen Behandlung aufgehoben.

Seitens der Empfänger hat nach geltenden ethischen Normen niemand einen Anspruch auf Körperteile eines lebenden oder toten Mitmenschen. Kranke dürfen jedoch zu ihrer Behandlung freiwillig gespendete Gewebe und Organe als Geschenk von anderen annehmen. Bis ein geeigneter Spender gefunden ist, vergehen manchmal Jahre. Für die Patienten ist die Wartezeit mit großen Einschränkungen verbunden. In Deutschland standen Anfang 2012 nach Angaben der europäischen Organvermittlungsagentur Eurotransplant 11.594 Patienten auf der Warteliste für ein Ersatzorgan. In der Transplantationsmedizin muss zwischen den Begriffen „Organ“ und „Gewebe“ unterschieden werden. Definitionsgemäß im Sinne des Gewebegesetzes sind Organe, mit Ausnahme der Haut, alle aus verschiedenen Geweben bestehenden Teile des menschlichen Körpers, die in Bezug auf Struktur, Blutgefäßversorgung und Fähigkeit zum Vollzug physiologischer Funktionen eine funktionale Einheit bilden. Dagegen umfasst der Begriff „Gewebe“ alle aus Zellen bestehenden Bestandteile des menschlichen Körpers, die keine Organe sind, einschließlich einzelner menschlicher Zellen. Es gibt mehrere Möglichkeiten, Gewebe für Transplantationen zu gewinnen:

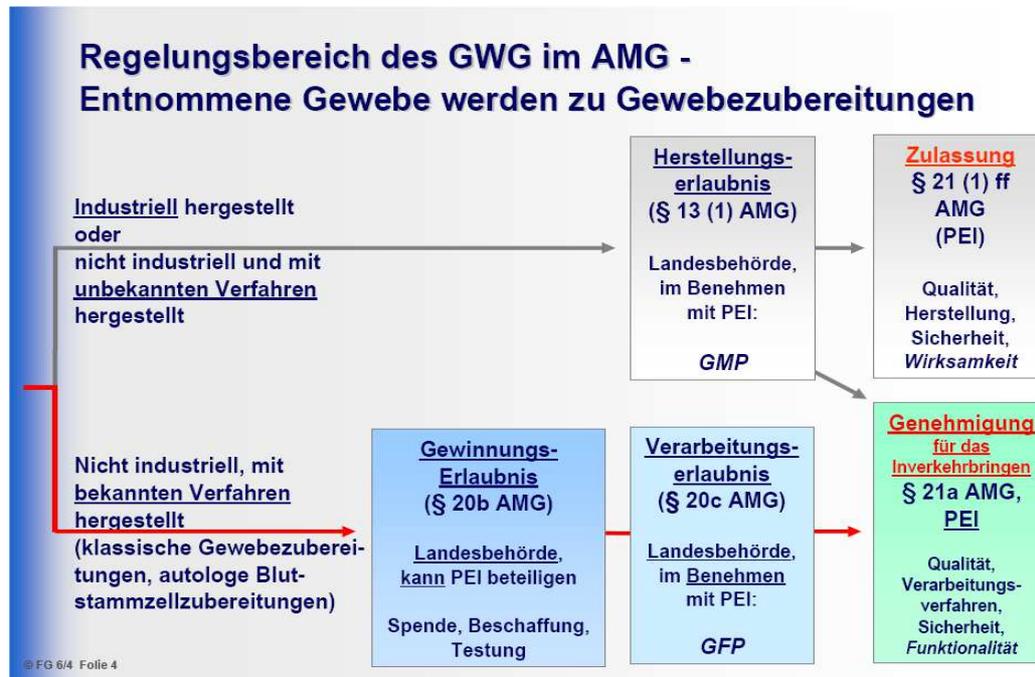
1. Im Rahmen der Lebendspende, die zumeist explantiertes und nicht mehr benötigtes Gewebe umfasst (z.B. Femurköpfe nach Hüft-TEP, Amnion von der nachgeburtlichen Plazenta, Herz des Patienten bei Herz-Tx)
2. Im Rahmen der Organspende bei hirntoten Patienten kann zusätzlich auch Gewebe entnommen werden,
3. Die Gewebespende bei Herzkreislauffoten.

Bei Leichenspenden kann Gewebe bis zu 24 h (Herzklappen, große thorakale und abdominale Gefäße), bis zu 36 h (muskuloskelettales Gewebe) und bis zu 72 h (Cornea) postmortem entnommen werden.

Die rechtliche Regulation der Gewebebanken in Deutschland hat sich durch das Inkrafttreten der EU-Direktiven 2004/23, 2006/17 und 2006/86 [27,28,29] erheblich verändert. Es ist infolge des am 20.07.2007 veröffentlichten deutschen Gewebegesetzes nunmehr erforderlich, für Hersteller von klassischen Gewebezubereitungen Erlaubnisse für die Gewebeentnahme und -testung (§20b AMG), die Herstellung, Konservierung, Lagerung und Abgabe (§20c AMG) bei der regional zuständigen Landesbehörde zu beantragen. Werden die Gewebezubereitungen an Dritte abgegeben, ist zusätzlich eine Genehmigung (§21a AMG) der Bundesoberbehörde, des Paul-Ehrlich-Institutes (PEI) notwendig. Regionale und überregionale Gewebe-

banken, die nach GMP-Bedingungen arbeiten, unterliegen den §§13 und 21 AMG. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 1 zusammengefasst:

Abbildung 1: Überblick Gewebegesetz



1.3. Infektionsrisiken bei der Übertragung von Blut und Geweben

Aufgrund der vergleichbaren Logistik der Herstellungs- und Prüfprozesse bei Blut- und Gewebespendern (humanes Material, Anamnese, Spenderuntersuchung, Testung auf Infektionsmarker, Qualitätskontrollen) ist eine detaillierte Darstellung der Infektionsrisiken von Blut- und Gewebespendern sinnvoll. Es ist gesichert, dass Viren wie das Hepatitis B Virus (HBV), das Hepatitis C Virus (HCV) und das Humane Immundefizienz Virus (HIV) auch durch Gewebe- und Organtransplantationen übertragen worden sind [13,14,20,25,38]. Die Erstbeschreibung des Risikos einer Übertragung von Hepatitis durch ein Knochentransplantat datiert aus dem Jahr 1954 [78]. Da jährlich in Deutschland insgesamt etwa 200-mal häufiger Bluttransfusionen als Gewebetransplantate klinisch eingesetzt werden, sind deutlich mehr Daten zu den Nebenwirkungen von Bluttransfusionen verfügbar.

Die Bluttransfusion beinhaltet in der Chronologie die Übertragung von Protozoen (Plasmodien 1911), Bakterien (*Treponema pallidum* 1915) und Viren in den 70er -und 80er Jahren (Hepatitis B, Hepatitis C und HIV). Auch die Übertragung von Prionen (Variante Jakob Creutzfeld Disease (vCJD) durch Blut [48] und durch Dura mater [6] ist gesichert.

Für die Herstellung und Anwendung von Blutprodukten gibt es mit der Hämotherapie-Richtlinie der Bundesärztekammer (BÄK) ein verbindliches Regelwerk, das durch Stufenpläne des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI) und Voten des Arbeitskreises Blut ergänzt und weiterent-

wickelt wird und seit 1998 in den §§ 12, 12a des Transfusionsgesetzes (TFG) gesetzlich verankert ist [7,8]. Die verschiedenen Maßnahmen zur Erhöhung der Spendesicherheit basieren auf einem mehrstufigen Prozess. Dieser beinhaltet die behördliche Überwachung der pharmazeutischen Unternehmer (Herstellungserlaubnis, Zulassung), einheitlich vorgeschriebene Tauglichkeitskriterien bei der Spenderauswahl, die Leukozytendepletion zellulärer Produkte und die infektionsserologische Pflichttestung (Anti-HIV, HIV-NAT, Anti-HCV, HCV-NAT, HBsAg, Anti-HBc und Treponema pallidum). Die infektionsserologische Testung wird traditionell mit Immunassays durchgeführt. Als Immunassays werden Methoden in der Bioanalytik bezeichnet, deren gemeinsames Grundprinzip die Erkennung und damit der Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Phase durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper ist. Je nach Konfiguration des Assays können sowohl Antigen als auch Antikörper der nachzuweisende Analyt sein. Zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung bedient man sich markierter Reagenzien. Häufig eingesetzt werden hierfür Enzyme, die eine chemische Reaktion katalysieren, bei der entweder durch ein Substrat eine bestimmte Farbe entsteht (chromogenes Substrat) oder Licht freigesetzt wird (Chemilumineszenz). Auf Enzymmarkierungen basierende Assays werden als Enzyme-linked Immunosorbent Assays (EIA) bezeichnet und stellen in der infektionsserologischen Testung das Haupttestprinzip dar. Ein weiteres optisches Verfahren wäre die Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen. In Radioimmunassays (RIA) werden schwachradioaktive Substanzen zur Markierung verwendet. Das Standardverfahren der Testung auf HCV- und HIV-Infektionen ist ein EIA zum Antikörpernachweis, der positiv wird, wenn das Immunsystem des Spenders mit dem jeweiligen Virus reagiert und Antikörper gebildet hat. Gleiches gilt für die Testung auf Antikörper gegen Treponema pallidum. Bei HBV wird auf das Vorhandensein eines Bestandteils der Virushülle, dem HBV-Oberflächenantigen (HBsAg) getestet. Im Rahmen der Blutspendertestung in Deutschland werden jährlich etwa 100 Infizierte mit HIV, 450 mit HCV, 700 mit HBV und 330 mit Treponema pallidum erkannt, die Spender gesperrt und ihre Spenden verworfen [57]. Die serologische Testung hat die Sicherheit von Blut- und Gewebespendern deutlich erhöht konnte aber nicht verhindern, dass Übertragungen von Infektionen durch Blutprodukte seronegativer Spender aufgetreten sind. Diese können kurz nach einer Infektion bereits infektiös sein, obwohl die serologische Testung noch negativ ist (serologische Latenzperiode, diagnostisches Fenster, „window-period“). Die diagnostischen Fenster werden für Anti-HIV mit 22 Tagen, für Anti-HCV und für das HBsAg mit etwa 60 Tagen angegeben [35]. Sie lassen sich durch zusätzliche Tests auf das jeweilige Virusgenom mittels NAT verringern [69], auch kann eine Quarantänelagerung bei lagerfähigen Blut- oder Gewebeprodukten (z.B. Gefrierplasma) erfolgen. Für den Zeitraum von Januar 1990 bis November 1997 wurden dem Paul-Ehrlich-Institut insgesamt 38 gesicherte HCV-Übertragungen durch Blutpräparate gemeldet. Untersuchungen an Serokonversionspanels zeigten, dass HCV-Genome bis zu 50 Tage vor

dem ersten erfolgreichen Antikörpernachweis mit Hilfe der NAT gefunden werden konnten. Blutspendedienste, die eine NAT-HCV-Testung durchführten, konnten zwischen 1996 und 1997 insgesamt elf Spender detektieren, die bereits HCV-Virusträger waren, aber noch keine Antikörper gebildet hatten. Die Vorteile der NAT wurden dadurch bestätigt, dass 1997 in fünf Fällen einer HCV-Blutübertragung die zugehörige seronegative Spende nachträglich mit Hilfe der NAT untersucht werden konnte und dabei HCV-Genome nachgewiesen wurden [61]. Nach Abschluss eines Stufenplanverfahrens wurde folgerichtig 1999 die NAT-HCV-Testung in Deutschland für zelluläre Blutprodukte verpflichtend. Fünf Jahre später wurde auch die NAT-HIV-Testung in Deutschland für zelluläre Blutprodukte verpflichtend vorgeschrieben [62]. Untersuchungen des Paul-Ehrlich-Instituts hatten gezeigt, dass das diagnostische Fenster der serologischen Testung bei HIV durch die NAT-HIV um durchschnittlich bis 15 Tage verkleinert werden kann. Untersuchungen der Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors in den USA zeigten ebenfalls eine Reduktion des diagnostischen Fensters durch die Einführung der NAT-HIV um 10-15 Tage auf zirka 10 Tage [10]. Zwischen 1997 und 2003 wurden dem Paul-Ehrlich-Institut vier HIV-Übertragungen durch zelluläre Blutprodukte gemeldet, die im Antikörpersuchtest negativ, aber in der NAT-HIV Testung aus den Rückstellproben positiv getestet wurden. Bei einem Vergleich von >37 Millionen Proben in den USA konnten in 12 Fällen NAT-HIV positive aber Anti-HIV negative Proben ermittelt werden. Dies entspricht einem Verhältnis von 1:3,1 Million und führt rechnerisch zur Vermeidung von 5 HIV Übertragungen jährlich. Für HCV konnten in den USA bei einem weiteren Vergleich von >39 Millionen Blutspendern 170 NAT-HCV positive aber Anti-HCV negative Proben ermittelt werden. Dies entspricht einem Verhältnis von 1:230.000 und erlaubt rechnerisch die Vermeidung von 56 HCV Übertragungen jährlich [80]. Auch für die NAT-HBV Testung konnte die erhöhte Sensitivität der NAT gegenüber serologischen Methoden gezeigt werden [47]. Die Arbeitsgruppe detektierte 7 NAT-HBV positive Proben, welche in drei lizenzierten HBsAg-EIA-Assays ausnahmslos falsch negativ getestet wurden. Auch ein anschließend benutzter HBsAg-EIA mit besonders hoher Sensitivität zeigte in diesem Vergleich nur in 3/7 Fälle ein positives und in 4/7 Fällen ein falsch negatives Ergebnis [47]. Die hohe Sensitivität der NAT zeigt sich auch darin, dass auch eine 50-fache Verdünnung bei frisch HIV- bzw. HCV-Infizierten mit noch negativem Antikörpernachweis zu keinem falsch negativen Ergebnis in der Testung führte [87]. Die Einführung der NAT-HCV Pflichttestung bei Blutspender 1999 in Deutschland verminderte die Anzahl von viralen Übertragungen auf zwei Fälle einer HCV-, und seit Einführung der NAT-HIV Pflichttestung im Jahr 2004 ebenfalls auf zwei Fälle einer HIV-Übertragung (Tabelle 2) [32]. Die NAT Testung macht jedoch die EIA-Testung nicht überflüssig. Es können auch falsch negative NAT-Befunde auftreten, beschrieben z.B. bei der NAT-HIV und gesicherter Anti-HIV1/2 Infektion [4].

Tabelle 2. Gemeldete Übertragungsfälle durch Blutprodukte Deutschland bei etwa 6-7 Millionen Spenden jährlich (Pflichttestung NAT grau hinterlegt)

Periode	97	98	99	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
HIV	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
HCV	6	13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
HBV	1	2	2	1	2	1	3	3	2	3	1	1	1	1	0	0

Das infektionsserologische Risiko muss bei Lebendgewebespendern gegenüber Blutspendern als erhöht eingeschätzt werden [17,91]. Dies wird damit begründet, dass viele Spender in einem höheren Lebensalter und aus transfusionsmedizinischer Sicht in der Regel «Erstspender» sind, die primär nicht beabsichtigen zu spenden, sondern erst wenige Tage vor der Operation über die Möglichkeit der Gewebespende informiert werden. Für Leichenspenden gilt ein nochmalig erhöhtes infektionsserologisches Risiko. Es wurden Prävalenzen zwischen dem Faktor 3-4 (HBsAg, HCV) und dem Faktor 9 (HIV) über den bekannten Prävalenzen für Erstspendern von Blut ermittelt [91]. Diese Arbeitsgruppe testete in den USA 11.391 Gewebespendern auf Anti-HIV, Anti-HCV und auf HBsAg und berechnete anhand der Ergebnisse die Prävalenz Raten für HIV (0,09%), HCV (1,1%) und HBsAg (0,23%). Die Autoren erklären diese erhöhte Unsicherheit bei Gewebespendern damit, dass Blutspender sorgfältig auf Basis medizinischen Befragung und Untersuchung ausgewählt werden können und dies bei Leichenspendern nicht in gleichem Maße durch alleinige Sicht der Krankenakte und Inspektion des Leichnams gelingt. Unter Hinzuziehung der aus dem Blutspendewesen bekannten diagnostischen Fenster wird das Risiko eines virämischen Leichenspenders für HIV mit 1:55.000, für HBV mit 1:34.000 und für HCV mit 1:42.000 Spenden angegeben. Bei 20.000 Gewebespendern/Jahr bedeutet dies für die USA ≤ 1 Spender/Jahr. Quantitativ wird das Risiko als gering eingeschätzt, risikoe erhöhend ist jedoch die sogenannte Spender-Empfänger-Ratio (Anzahl von Empfänger, die Gewebetransplantate eines Spenders erhalten). Bei Blutkonserven beträgt diese im Normalfall 1:1, bei Augenhornhäuten 1:2, bei kardiovaskulären Transplantaten 1:1 bis 1:10 und bei muskuloskelettalen Geweben bis zu 1:40, so dass hier die Übertragungsfahr besonders relevant wird. Die Transplantation eines HCV-infizierten Organs führt in über 60% zu einer Virämie der Empfänger [65].

Im Vergleich zu Blutprodukten wurden aufgrund der deutlich niedrigen Anzahl von Transplantationen weniger Übertragungen von klinisch relevanten Viren durch Gewebetransplantate beschrieben. Im Zeitraum zwischen 1984-2010 werden in einer Übersichtsarbeit etwa 20 Übertragungen von HIV und HCV durch muskuloskelettales Gewebe und Haut zusammengestellt [38]. In der Mehrzahl wurde zum Zeitpunkt der Transplantation das Gewebe noch nicht auf infektionsserologische Marker untersucht, bzw. lag das Ergebnis vor

Transplantation noch nicht vor. Zwischen 1984 und 1996 wurden 9 Fälle der Übertragung von HIV durch die Transplantation muskuloskelettalen Gewebes beschrieben. In allen Fällen war eine infektionsserologische Testung nicht durchgeführt worden, die letzte Übertragung datiert aus dem Jahr 1996 durch ein Femurkopftransplantat. Die 34-jährige Spenderin wurde 5 Monate später nach Auftreten klinischer Symptome als HIV-infiziert identifiziert. In 10 Fällen kam es zur Übertragung von HCV durch die Transplantation von muskuloskelettalem Gewebe, die letzte Übertragung datiert aus dem Jahr 2000. Die Mehrzahl der Spender war nicht getestet worden, bei zwei Spendern wurde ein falsch negatives Testergebnis für Anti-HCV ermittelt. In allen 10 Fällen war das Gewebe keinem Sterilisationsprozess unterzogen worden. Bei Empfängern von Geweben desselben infektiösen Spenders, dessen Transplantate prozessiert (mechanische Präparationen, Spülungen zur Reinigung und Entfernung der Restblutmenge) und abschließend lyophilisiert worden waren, traten keine Infektionsübertragungen auf [83]. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden weiteren Übertragungen durch Gewebe beschrieben. Im Jahr 2011 ist bei einem Anti-HCV-negativen Multiorganspender die NAT-HCV Testung zwar positiv bestimmt, jedoch irrtümlich als negativ deklariert worden. Von diesem Spender wurden insgesamt 43 muskuloskelettale und 1 kardiopulmonales Gewebe und Nieren und Leber transplantiert. Die HCV Übertragungen erfolgten ausschließlich über die Nieren und das kardiopulmonale Gefäßtransplantat, während 15 muskuloskelettale Gewebetransplantate, die chemisch oder durch Bestrahlung virusinaktiviert worden waren, zu keiner Transmission führten [14].

Hepatitis B und -C Übertragungen durch Cornea bzw. kardiovaskuläres Gewebe wurden selten beobachtet. Im Zeitraum zwischen 1984-2000 sind insgesamt 3 HBV-Übertragungen (2 Cornea-Transplantate, 1 Aortenklappen-Allograft) und 1 HCV-Übertragung (Gefäßtransplantat) beschrieben [39,53,83]. Bedingt durch die Blut- und Lymphgefäßfreiheit der Augenhornhaut scheint eine Viruslast in der Cornea infizierter Spender deutlich vermindert zu sein. In einer klinischen Untersuchung waren bei 6 HBV- bzw. 6 HCV-NAT-positiven Spendern Virusgenome im Corneagewebe nicht nachweisbar [77]. Im Gegensatz hierzu fanden andere Autoren in 7/29 Corneae Anti-HCV positiver Spender HCV-Genom [44]. Bis heute sind jedoch keine HIV- bzw. HCV-Übertragungen durch Corneae beschrieben worden, obwohl 4 Corneae transplantiert worden sind, deren zwei Spender später Anti-HIV positiv getestet wurden [76]. Klinisch relevante Virusübertragungen durch Augenhornhäute wurden vereinzelt mit Herpes-simplex-Viren (HSV) berichtet [72,82]. Im Rahmen einer Untersuchung der Eye Bank Association of Amerika (EBAA) wurden in einem 12-jährigen Beobachtungszeitraum in den USA nach der Transplantation von mehr als 400.000 serologisch negativ getesteter Corneatransplantaten keine HIV-, HBV- oder HCV-Infektion nachgewiesen [34]. Die beschriebene HBV-Übertragung durch ein Aortenklappen-Allograft muss mit Zurückhaltung betrachtet werden, da der Spender HBsAg-positiv getestet war, aber das Allograft trotzdem

transplantiert wurde. HIV- und HCV-Übertragungen durch Herzklappen sind nicht bekannt, obwohl die Transplantation von 3 Herzklappen von 2 NAT-HCV positiven Spendern beschrieben ist, welche nicht zur Infektion des Empfängers geführt haben [67]. Eine HCV-Übertragung durch ein Venentransplantat aus dem Jahr 2000 ist die einzige Transmission durch Gefäße [83].

Auch Übertragungen von Bakterien durch allogene Knochen transplantate sind beschrieben worden. In einer Studie aus dem Jahr 2002, die 250 Empfänger allogener Knochen transplantate einschloss, wurden 4 transplantatassoziierte Infektionen (1,6%) nachgewiesen [49]. Im November 2001 erlag ein Patient nach der Transplantation eines allogenen Femurkondylus 4 Tage postoperativ einem schweren septischen Schock. Sowohl in der Blutkultur als auch in der Nachuntersuchung von Rückstellmustern des Knochengewebespenders wurde *Clostridium sordelli* isoliert. Ein weiterer Patient, der Knochengewebe desselben Spenders erhielt, entwickelte ebenfalls eine Infektion mit *Clostridium sordelli* [40]. Weitergehende Untersuchungen des Center for Disease Control and Prevention (CDC) in US-amerikanischen Gewebebanken zeigten, dass im Zeitraum 2000–2002 weitere 24 Patienten transplantatbedingte Infektionen erlitten. Alle Gewebe wurden aseptisch entnommen, jedoch keinem terminalen Desinfektions- bzw. Sterilisationsverfahren unterzogen [15].

In der einschlägigen gültigen Europäischen Richtlinie 2006/17/EG, eine Durchführungsrichtlinie der dem Gewebegesetz zugrunde liegenden Richtlinie 2004/23/EG, die in Deutschland in der TPG-Gewebeverordnung (TPG-GewV) umgesetzt wurde, werden für die Testung von Gewebespendern die Standardtestung mittels Anti-HCV, Anti-HIV und HBsAg sowie ein Anti-HBc-Test gefordert [9]. Prämortale Blutproben sollten nicht älter als 7 Tage, bei +2 bis +8 °C gelagert und unmittelbar nach Blutabnahme zentrifugiert worden sein. Diese Vorgaben können jedoch nicht immer erfüllt werden, insbesondere in den Fällen, in denen es sich nicht um Multiorganspender handelt (z.B. Spender aus Rechtsmedizinischen Instituten). Bei diesen Spendern stehen häufig prämortale Blutproben nicht zur Verfügung bzw. haben das zulässige Zeitfenster überschritten. In diesen Fällen muss auf p.m. Blut zurückgegriffen werden, dessen Entnahme gemäß den geltenden Richtlinien maximal bis zu 24 Stunden post mortem erfolgen kann.

Zusammengefasst bleibt festzuhalten, dass Gewebetransplantate HIV, HCV und HBV übertragen können. Dies ist ein insgesamt seltenes Ereignis und betrifft bisher fast ausschließlich nicht prozessierte bzw. nicht virusinaktivierte, muskuloskelettale Gewebe. Eine Pathogeninaktivierung ist nur bei muskuloskelettalem Gewebe, nicht aber bei Cornea oder kardiovaskulärem Gewebe möglich. Im Falle der Transplantation von Geweben infizierter Spender ist die Übertragungswahrscheinlichkeit hoch, z.B. für HCV >60% [65].

Unstrittig müssen sowohl die serologische Testung auf Anti-HIV-1/2, HBsAg, Anti-HBc, Anti-HCV, Anti-Treponema-pallidum als auch die NAT Testung aus p.m. Blut validiert werden. Nach dem Tod kommt es zu Veränderungen des Blutes, wie z.B. Hämolyse, Autolyse, bakterielles Wachstum etc. Dies kann die Bestimmung von Infektionsmarkern erschweren und führt zu eventuellen unspezifischen Reaktionen und als Konsequenz zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen. Zusätzlich können prä mortal gegebene Transfusionen und Blutprodukte zu signifikanten Verdünnungseffekten führen.

1.4. Infektionsserologische Testung aus postmortalem Blut

Eine infektionsserologische Testung ist für die Empfängersicherheit unverzichtbar. Eine Risikostratifizierung der Spender allein auf Basis der medizinischen oder sozialen Anamnese gelingt nicht. Bei 18/785 (2,3%) Gewebespendern, die positiv getestet worden waren, zeigten sich keine Prediktoren, die mit einer signifikant erhöhten Infektionsrate assoziiert gewesen sind [88]. Die infektionsserologische Testung erfolgt beim Screening von Blutspendern routinemäßig aus frisch entnommenen Blutproben. Die Angaben in der Literatur zur Testung aus p.m. Blut sind limitiert. Ein initialer Vergleich von drei kommerziellen Anti-HIV-EIA bei 35 bekannten AIDS Patienten ergab 1987 (nur) eine Sensitivität von 94,3%, 94,3% und 97,1% [64]. Die durchschnittliche p.m.-Entnahmezeit betrug 27 h, richtig positive Ergebnisse konnten noch aus 35 h p.m. Proben ermittelt werden. Falsch positive bzw. falsch negative Reaktionen zeigten keine Korrelation zur Hämolyse. 34 von 35 HIV-positive Spender wurden richtig positiv bestätigt, 1 von 35 HIV-positiven Spendern wurde mit drei verschiedenen HIV-EIA falsch negativ getestet. Die Autoren führten dies auf mögliche p.m. auftretende Titerreduktionen der HIV-Antikörper zurück und betonen daher die Bedeutung der Anamnese. Eine parallele Messung von prä- und p.m. Proben fand in dieser Studie nicht statt. In einer späteren Studie ermittelte derselbe Autor eine Korrelation zwischen 73% und 87% beim Vergleich eines Western-Blot-Testes mit drei kommerziellen Anti-HIV-EIA bei weiteren 118 Leichenspendern mit hohem HIV-Risiko [63]. Ein EIA für HBsAg zeigte hierbei eine Sensitivität von 92,9% und eine Spezifität von 81,3% im Vergleich zu einem Radioimmunassay (RIA). Die Rate an positiven Befunden bei Gewebespendern für Anti-HIV, Anti-HCV und HBsAg schwankt in der Literatur deutlich. Pereira beschreibt für Anti-HCV mit einem EIA der 1. Generation bei 3078 getesteten Gewebespendern eine Spannbreite von 1,5% bis zu 16,7% allein innerhalb der USA [66]. In einer retrospektiven Studie an 1833 Gewebespendern konnte gezeigt werden, dass eine große Variabilität der Rate auffälliger infektionsserologischer Testungen (0% bis 42%) nicht ausschließlich auf unterschiedliche Durchseuchungsraten zurückzuführen waren [79]. Die Autoren führen dies auf die Vielzahl eingesetzter, für p.m. Blut nicht validierter Testsysteme zurück und konnten die Variabilitäten in Abhängigkeit unter-

schiedlicher Testsysteme belegen. Neben dem Einfluss der Testsysteme beschreibt der Autor die Bedeutung der maximalen Entnahmezeit nach Eintritt des Todes. Bei >24 h p.m. Zeiten nahm die Anzahl positiver infektionsserologischer Untersuchungen von 3,5% auf 14% zu. Auch eine weitere Arbeitsgruppe fand eine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der p.m. Probenentnahme und der Rate von positiven Testergebnissen, welche in 25% bei einem Zeitintervall <12 h und in 54,5% bei einem Zeitintervall >36 h zu einem Verwurf des Gewebes führte. Die Zunahme falsch positiver Testergebnisse in p.m. Blut wurde bereits 1996 beschrieben und auf den Einfluss von Auto- und Hämolyse zurückgeführt [56]. Die Autoren fanden diese Auffälligkeit im Besonderen für einige firmenspezifische Testkits, ein falsch negatives Ergebnis fanden sie nicht. Keiner der Autoren hatte jedoch prä- und p.m. Proben derselben Spender gegeneinander verglichen. Mit diesem Studiendesign wurden 33 prä- und p.m. Blutproben identer Spender verglichen [37]. Das maximale Zeitfenster der prämortalen Probenentnahme betrug <17 Tage. Nur 16/33 Proben ergaben im Paarvergleich konkordante Ergebnisse. Zwei HBsAg positive prämortale Proben wurden korrekt p.m. bestätigt und in 16 Fällen wurden p.m. falsch positive Ergebnisse für HBsAg ermittelt. In zwei weiteren Fällen wurde Anti-HIV p.m. falsch positiv bestimmt, eine der Proben hatte deutliche makroskopisch sichtbare Auffälligkeiten (Hämolyse). Hervorzuheben ist die falsch negative Anti-HCV Testung einer p.m. Probe bei bekannter prämortaler bestätigter HCV-Infektion. Dieses falsch negative Ergebnis ist besonders relevant, da es zur Transmission von HCV durch die Transplantate hätten führen können. Die hohe Anzahl von falsch positiven HBsAg Bestimmungen führen die Autoren auf eine Beeinflussung der Testkits durch Hämolyse und Autolyse zurück und resümieren, dass die Risiken der Testung p.m. Blutes nicht ausreichend untersucht sind. Eine Limitierung dieser Studie wird damit begründet, dass der Einfluss der Zeit nicht anhand verschiedener Messpunkte untersucht wurde, sondern p.m. nur einmalig getestet worden war. Auch ist keine Aussage zur Sensitivität bei Anti-HIV möglich, da kein Spender mit prä-mortaler bekannter HIV-Infektion eingeschlossen wurde. Die unzureichende Reproduzierbarkeit der infektionsserologischen Testergebnisse ist konkordant mit den Arbeiten von [16,79], die daher eine Verkürzung des p.m. Entnahmezeitpunktes empfohlen hatten. Andere Autoren legen in der Abwägung „Empfängersicherheit versus Organ/Gewebeverlust“ ihr Hauptaugenmerk auf eine mögliche Vermeidung des Verlustes von Organen und Geweben [65,66,67]. Die Autoren beschreiben die Möglichkeit, auch Organe von bekannt infizierten Multiorganspendern zu verwenden. Sie berufen sich dabei auf Arbeiten, nach denen die Prävalenz von HCV bei Organempfängern von HCV-positiven Spendern zwar 67% (Anti-HCV-Antikörper) und 96% (HCV-RNA) beträgt, aber die Überlebenszeit der Organe hiervon nicht betroffen ist [51]. Die Autoren ziehen daher in Betracht, HCV-RNA positiven Empfängern auch Organe und Gewebe HCV-RNA positiver Spender zu transplantieren, obwohl in diesen Fällen in >90% eine Virämie im Empfänger nachweisbar wird. Auch die Nierentransplantatio-

nen von Hepatitis B infizierter Spender führten zu keinem Transplantationsversagen oder einer kurzfristigen Mortalitätserhöhung [73].

Zusammengefasst liegen keine aktuellen Daten zum Vergleich der infektionsserologischen Testung zwischen prä- und p.m. Proben vor, im Besonderen wurde bisher die Kinetik der Antikörper p.m. nicht untersucht.

1.5. NAT-Testung aus postmortalem Blut

Die Nucleic Acid Amplification Test Technology (NAT) steht in der Medizin für eine Gruppe von Verfahren, bei denen Nukleinsäuren vervielfältigt werden, so dass auch geringe Mengen nachweisbar werden. Das bekannteste Verfahren ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR wurde 1983 durch Kary Mullis entscheidend weiterentwickelt. Die Technik nutzt bestimmte Enzyme (DNA-Polymerase), um DNA ausgehend von zwei kleinen Startmolekülen, auch Primer genannt, immer wieder identisch zu kopieren. Die Primer werden genau so gewählt, dass sie den gewünschten Bereich auf der DNA zu beiden Seiten hin begrenzen. In jedem Vermehrungsschritt verdoppeln die Enzyme nun das Stück DNA zwischen den beiden Primern. Das führt schon nach wenigen Zyklen zu einer enormen Vervielfältigung der DNA-Moleküle. Zehn Jahre später wurde Mullis hierfür 1993 der Nobelpreis für Chemie verliehen. Auch virale Erkrankungen können mit dieser Technik erkannt werden, indem man Virus-DNA vervielfältigt bzw. bei RNA-Viren diese RNA erst in DNA umschreibt und dann mittels PCR vervielfältigt (die RT-PCR). Der direkte Erregernachweis verkürzt das diagnostische Fenster, da eine Antikörperbildung durch das Immunsystem nicht abgewartet werden muss. Mit der NAT konnten von 2119 Anti-HCV negativen Organspendern 5 solitär NAT-HCV positive Spender und aus 631 Anti-HCV negativen Gewebespendern 1 solitär NAT-HCV positiver Spender identifiziert werden. Es wurden in 2 Fällen Organe und in einem Fall Gewebe transplantiert, eine Nachtestung der Empfänger war nicht möglich [17]. Im Jahr 2005 wurden HCV-Übertragungen in 8 Fällen durch Gewebe- und Organtransplantate eines Anti-HCV negativen Multiorganspenders bekannt. Im durchgeführten look-back Verfahren wurde in der Rückstellprobe des Anti-HCV-negativen Spenders HCV-Genom mittels NAT-HCV nachgewiesen [83]. Kürzlich wurde erneut von einer HCV Übertragung durch einen Multiorganspender berichtet. In diesem Fall wurde bei einem serologisch Anti-HCV negativen Multiorganspender die HCV-NAT positiv bestimmt, jedoch irrtümlich als negativ deklariert. Von diesem Spender wurden die Nieren, die Leber und 43 muskuloskelettale und ein kardiopulmonales Gewebe transplantiert. Die HCV Übertragung erfolgte ausschließlich über die Nieren und das kardiopulmonale Gefäßtransplantat, während 15 muskuloskelettale Gewebetransplantate, welche chemisch und durch Bestrahlung virusinaktiviert worden waren, zu keiner Transmission führten [14].

Trotz der aufgezeigten Vorteile der NAT gegenüber serologischen Nachweismethoden ist ein Einsatz bei Gewebespendern weiterhin problematisch, da kommerzielle NAT-Assays üblicherweise nicht für die Testung von p.m. Blutproben validiert und lizenziert sind.

1.6. Rechtliche Anforderungen an die Testung aus postmortalem Blut

Zur Steigerung der Sicherheit von Organ- und Gewebespenden hat die WHO (World Health Organisation) das Programm NOTIFY ins Leben gerufen. Es wurden Standards definiert, die vergleichbar mit den deutschen und europäischen Gesetzestexten sind:

1. Herstellungs- und Zulassungspflicht für Gewebebanken
2. Freiwillige Spende und unterschriebene Einverständniserklärung
3. Medizinische und soziale Anamneseerhebung, Einhaltung von Ausschlusskriterien
4. klinische Untersuchung/Inspektion
5. Testung auf übertragbare Krankheitserreger mittels EIA und NAT-Methoden durch lizenzierte Testlabore und -systeme.

Diese allgemeingültigen Anforderungen an die Sicherheit von Gewebespenden sind in Deutschland in den Anlagen der TPG-GewV definiert und umfassen im Wesentlichen folgende Schwerpunkte:

1. Anlage 1: Anforderungen an die ärztliche Beurteilung der medizinischen Eignung des toten Spenders nach § 3 Abs. 1
2. Anlage 2: Anforderungen an die ärztliche Beurteilung der medizinischen Eignung des lebenden Spenders nach § 3 Abs. 2
3. Anlage 3: Erforderliche Laboruntersuchungen und Untersuchungsverfahren nach § 4

Die oben genannten Dokumente sind der Arbeit im Kapitel „Anlagen“ im Originaltext beige-fügt. Während die Hinweise zu den Anforderungen an die ärztliche Beurteilung der medizinischen Eignung klar und unmissverständlich definiert sind, bleiben einige Fragen hinsichtlich der Laboruntersuchungen, insbesondere für p.m. Blut, offen. Hierbei ist Punkt „2a“ der Anlage 3 TPG-GewV von großer Bedeutung:

„2. Allgemeine Anforderungen an das Untersuchungsverfahren“: a) „Das angewandte Untersuchungsverfahren muss im Hinblick auf seinen Verwendungszweck nach dem allgemeinen Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik anerkannt sein.“

Sämtliche Testsysteme zum Nachweis von HIV-, HCV- und HBV-Infektionen müssen innerhalb der Europäischen Union den Anforderungen der Richtlinie 98/79/EC und den Common Technical Specifications (CTS) entsprechen. Die CTS fordern Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität der Testmethoden, die mittels Testgeräten mit CE-Kennzeichnungen

durchgeführt werden. Die Untersuchungen sollen an Serum- oder EDTA-Proben erfolgen. Im Allgemeinen sind CE-gekennzeichnete Untersuchungsgeräte für Testdurchführungen mit Leichenblut bzw. p.m. Blut jedoch nicht validiert.

Des Weiteren bleibt offen, auf welcher Grundlage die Forderungen des Abschnitts „2d“ der TPG-GewV erhoben worden sind: „Bei toten Spendern müssen die Blutproben so schnell wie möglich und nicht später als 24 Stunden nach dem Tod entnommen werden, es sei denn, es liegt bereits eine Blutprobe vor, die unmittelbar vor dem Tod entnommen worden ist.“

Wie bereits ausführlich dargestellt, wurden bisher lediglich in zwei Studien erste Hinweise auf den Einfluss der p.m. Probenentnahmezeit auf die Ergebnisse der infektionsserologischen Testung diskutiert. Die Beschränkung einer p.m. Probenentnahmezeit auf 24 Stunden ist daher bisher nicht wissenschaftlich begründet.

Somit bleibt die Klärung offener Fragen zur Methodenvollständigung, Stabilität von Infektionsparametern p.m. und präanalytischen Störgrößen notwendig, da bei einer Vielzahl von potentiellen Gewebespenden kein prämortales Blut zur Verfügung steht und damit die Gewinnung von Geweben bzw. die Bereitstellung von dringend benötigten Gewebetransplantaten eingeschränkt ist.

2. Fragestellung

Die bei Blutspendern verwendeten infektionsserologischen und Nukleinsäure-Amplifikations-Technik (NAT) Teste für HIV, HBV und HCV Infektionen sind bisher für prämortale, aber nicht für p.m. Proben validiert und lizenziert. Gleiches gilt für die infektionsserologische Testung auf *Treponema pallidum*.

Darüber hinaus legt die Transplantationsgesetz-Gewebeverordnung (TPG-GewV) einen Probenentnahmezeitpunkt von maximal 24 Stunden p.m. fest. Hierdurch müssen zahlreiche potentielle Gewebespenders trotz eines erlaubten Explantationszeitfensters bis 72 Stunden für die Cornea ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede bei der prä- und p.m. Infektionstestung aus Blutproben desselben Gewebespenders?
2. Ist der sichere Nachweis von Anti-HIV $\frac{1}{2}$, HBsAg, Anti-HBc und/oder Anti-HCV aus Blutproben von potenziell infektiösen Spendern bis zu 48 Stunden p.m. möglich?
3. Wie ist die Validierung von infektionsserologischen und NAT-Testsystemen für p.m. Blutproben zuverlässig durchzuführen?

Die Zielstellung der Projekte lag in der Erarbeitung von Daten zur Standardisierung der p.m. Labortestung und in der Findung von Argumenten zur Erhöhung des 24-Stundenintervalls für die p.m. Blutprobengewinnung.

3. Eigene Arbeiten

Die in Abschnitt 2 definierten Fragestellungen konnten durch umfangreiche experimentelle und epidemiologische Untersuchungen beantwortet werden. Die jeweiligen Ergebnisse wurden in peer-reviewed Journalen publiziert (Originaltitel):

1. Wilkemeyer I, Pruss A, Kalus U*, Schroeter J*. Comparative infectious serology testing of pre- and post-mortem blood samples from cornea donors. *Cell Tissue Bank* 2012;13: 447-52. (* shared senior authorship)
2. Edler C, Wulff B, Schröder AS, Wilkemeyer I, Polywka S, Meyer T, Kalus U*, Pruss A*. A prospective time-course study on serological testing for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus with blood samples taken up to 48 h after death. *Med Microbiol* 2011; 60: 920-6. (* shared senior authorship)
3. Kalus U, Wilkemeyer I, Caspari G, Schroeter J, Pruss A. Validation of the Serological Testing for Anti-HIV-1/2, Anti-HCV, HBsAg, and Anti-HBc from Post-mortem Blood on the Siemens-BEP-III Automatic System. *Transfus Med Hemother* 2011; 38: 365-72.
4. Kalus U, Wilkemeyer I, Pruss A, Caspari G. Validation of Serological Testing for Anti-Treponema pallidum from Postmortem Blood on the Siemens-BEP-III Automatic. *Transfus Med Hemother* 2013; accepted on April 30th (MS No. 201301012)
5. Gubbe K, Scharnagl Y, Grosch, S, Tonn T, Schmidt M, Hourfar KM, Karl A, Seifried, E, Wilkemeyer I, Kalus U. Validation of Virus NAT for HIV, HCV, HBV and HAV Using Post-Mortal Blood Samples. *Transfus Med Hemother* 2012; 3: 381–5

Nachfolgend werden diese Publikationen mit jeweils einer kurzen Zusammenfassung vorgestellt.

3.1. Wilkemeyer I, Pruss A, Kalus U, Schroeter J. Comparative infectious serology testing of pre- and post-mortem blood samples from cornea donors. Cell Tissue Bank 2012;13: 447-52.

In einer retrospektiven Analyse wurden bei 487 Hornhautspendern die infektionsserologischen Befunde aus jeweils einer prä- und einer p.m. Blutprobe ermittelt und unter Berücksichtigung des Alters, des Geschlechts und der p.m. Abnahmezeit ausgewertet. Die prämortalen Blutproben der Hornhautspender waren nicht älter als sieben Tage. Die Messungen der prämortalen Blutproben erfolgten an einem automatisierten System unter Routinebedingungen (BEP-III-System, Fa Siemens, Eschborn, Deutschland) mittels den zugehörigen CE-zertifizierten EIA-Testen und die Messung der p.m. Proben an einem zweiten Automaten-system (Cobas 6000, Fa Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse galt die prämortale Blutprobe als Referenzmaterial. Postmortale negative Ergebnisse wurden als falsch negativ eingestuft, falls die prämortale Vergleichsprobe positiv war. Es kam zu Diskrepanzen in insgesamt 21 Fällen (4,3%), davon 0,8% falsch negativ und 3,5% falsch positiv. Die Blutproben wurden p.m. zwischen 24-66 h (Gruppe 1, n=262) und zwischen 3-24 h (Gruppe 2, n=225) entnommen. Es ergaben sich 17 (13 falsch positive, 4 falsch negative) Diskrepanzen in Gruppe 1, und 4 (4 falsch positive, 0 falsch negative) Diskrepanzen in Gruppe 2.

HBsAg: Bei 7 Spendern (1,4 %) wurden abweichende Ergebnisse festgestellt. Davon waren bei 3 Spendern die prämortalen Blutproben positiv und die postmortalen negativ. Bei keinem dieser Fälle konnte eine anschließende HBV-PCR durchgeführt werden, da kein p.m. Blut mehr vorhanden war. Bei 4 Spendern war die prämortale Probe negativ und die postmortale positiv. In 2 Fällen konnte eine HBV-PCR durchgeführt werden, die ein negatives Ergebnis zeigte.

Anti-HBs: Bei 3 Spendern (0,6 %) wurden Diskrepanzen festgestellt. Bei allen Spendern waren die prämortalen Blutproben positiv und die postmortalen negativ. Die Testungen der drei Spender auf HBsAg und Anti-HBc IgG+IgM waren prä- und p.m. negativ.

Anti-HBc IgG+IgM: Bei einem Spender (0,2 %) wurde ein diskrepantes Ergebnis festgestellt. Dieser Spender war prä mortal negativ, aber p.m. positiv. Die Testungen auf Anti-HBs und HBsAg waren prä- und postmortal negativ.

Anti-HCV: Bei einem Spender (0,2 %) wurde ein abweichendes Ergebnis festgestellt. Bei diesem Spender war die prä mortale Blutprobe Anti-HCV positiv, aber die postmortale Anti-HCV negativ. Eine anschließend durchgeführte HCV-PCR der prä mortalen Blutprobe bestätigte ein positives Ergebnis. Bei der p.m. Blutprobe konnte keine HCV-PCR durchgeführt werden, da kein Material mehr verfügbar war.

Anti-HIV1/2: Bei 4 Spendern (0,8 %) wurden Diskrepanzen festgestellt. Alle 4 Spender waren prä mortal Anti-HIV 1/2 negativ und postmortal Anti-HIV 1/2 positiv. Eine HIV-PCR wurde in

einem der Fälle veranlasst, die Probenmenge musste dabei 1:5 verdünnt werden und es konnte keine HIV-RNA nachgewiesen werden.

Treponema pallidum: Bei 5 Spendern (1,0 %) wurden abweichende Ergebnisse festgestellt. Bei allen Spendern waren die prä-mortalen Blutproben negativ und die post-mortalen positiv. Die 5 positiven Proben waren in der Ergänzungstestung VDRL (Venereal Disease Research Laboratory Test) bzw. FTA-ABS IgG+IgM (Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Absorptionstest) negativ.

Im Gegensatz zu den bisherigen Angaben in der Literatur, dass in über 50% Diskrepanzen zwischen prä- und p.m. Proben auftreten, fanden wir eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse, obwohl zwei unterschiedliche Testverfahren eingesetzt worden sind. Es darf vermutet werden, dass eine Testung mit demselben Testverfahren und eine optimierte Standardisierung der präanalytischen Probenverarbeitung die Rate konkordanter Ergebnisse weiter steigern kann.

3.2. Edler C, Wulff B, Schröder AS, Wilkemeyer I, Polywka S, Meyer T, Kalus U, Pruss A. A prospective time-course study on serological testing for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus with blood samples taken up to 48 h after death. Med Microbiol 2011; 60: 920-6.

In die Studie wurden Verstorbene mit gesicherter oder sehr wahrscheinlicher HIV- und/oder, HBV- und/oder HCV-Infektion oder gesichertem Hinweis auf eine positive Infektionsserologie eingeschlossen. Nach deren Eintreffen im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf erfolgten die Todeszeitbestimmung gemäß den rechtsmedizinischen Vorgaben sowie die Erfassung der Infektionsanamnese. Die Verstorbenen wurden im gesamten Untersuchungszeitraum im Kühlraum des Institutes unter Temperaturüberwachung bei +7 bis +9°C gelagert. Die Blutentnahmen erfolgten nach Einlieferung sowie nach 12, 24, 36 und 48 Stunden. Mittels steriler Punktionskanüle wurden 20ml Vollblut aus peripheren großen Gefäßen (A./V. femoralis, A./V. subclavia) entnommen, in Ausnahmefällen war die Punktion des Herzens nötig. Die Proben wurden im direkten Anschluss an die Entnahme zentrifugiert, ein Teil des Serums wurde danach bei +2-+6°C gelagert und innerhalb von 12 Stunden im infektionsserologischen Labor des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie, gemessen. Die Messungen erfolgten am Architect-System der Firma Abbott Diagnostics (Wiesbaden, Deutschland) mittels EIA-Test. Der zweite Teil der Serumproben wurde unverzüglich eingefroren und bei unter -70°C zwischengelagert. Die Messung dieser Proben erfolgte im infektionsserologischen Labor der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Institut für Transfusionsmedizin, Campus Charité Mitte innerhalb von maximal 9 Monaten am BEP-III-System der Firma Siemens (Eschborn, Deutschland) mittels EIA-Teste.

HIV ½: Insgesamt konnten 6 Verstorbene (5 Männer/1 Frau) im Alter von 37 bis 61 Jahre eingeschlossen werden. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Einlieferung Anti-HIV positiv. In den Folgemessungen bis 48 Stunden p.m. blieben alle Befunde eindeutig positiv. Fragliche oder grenzwertige Befunde wurden nicht erhoben. Alle Befunde wurden durch die Kontrollmessung in der Charité bestätigt. HBV: Insgesamt konnten 5 Verstorbene (4 Männer/1 Frau) im Alter von 37 bis 61 ausgewertet werden. Alle Probanden waren zum Zeitpunkt der Einlieferung HBsAg. In den Folgemessungen bis 48 Stunden p.m. blieben alle Befunde eindeutig positiv. Fragliche oder grenzwertige Befunde wurden nicht erhoben. Alle Befunde wurden durch die Kontrollmessung in der Charité bestätigt. Anti-HBc: 9 Probanden waren bei Einlieferung aHBc positiv. In den Folgemessungen bis 48 Stunden p.m. (1 Proband bis 36 Stunden, da keine 48 h Messung durchgeführt werden konnte) blieben alle Befunde eindeutig positiv. Fragliche oder grenzwertige Befunde wurden in Hamburg nicht erhoben. In den Kontrollmessungen in der Charité konnten 5 positive Messergebnisse nicht bestätigt werden.

HCV: Insgesamt konnten 17 Verstorbene (12 Männer/5 Frauen) im Alter von 26 bis 81 Jahre eingeschlossen werden. Alle Probanden waren bei Einlieferung und 16/17 Probanden bis zu 48 Stunden und 1/17 bis zu 36 Stunden p.m. Anti-HCV positiv. Fragliche oder grenzwertige Befunde wurden nicht erhoben. Alle Befunde wurden durch die Kontrollmessung in der Charité bestätigt. Als Kontrollgruppe wurden zusätzlich 12 Augenhornhautspender mit bekannt negativer Eingangsserologie p.m. untersucht. Bis zu 48 Stunden zeigten sich keine falsch positiven oder grenzwertigen Befunde, so dass die maximale Probenentnahmezeit auf 48 h p.m. ausgedehnt werden könnte.

3.3. Kalus U, Wilkemeyer I, Caspari G, Schroeter J, Pruss A. Validation of the Serological Testing for Anti-HIV-1/2, Anti-HCV, HBsAg, and Anti-HBc from Post-mortem Blood on the Siemens-BEP-III Automatic System. Transfus Med Hemother 2011; 38: 365-72

Prä- und Post-mortem-Seren von 20 Hornhautspendern der Universitätsgewebebank der Charité, Hornhautbank Berlin, Campus Virchow-Klinikum wurden auf Anti-HIV-1/2, Anti-HCV, HBsAg und Anti-HBc mit dem Siemens-BEP-III-Automatic-System getestet und miteinander verglichen. Negative p.m. Seren wurden darüber hinaus mit Referenzseren (PEI Anti-HCV IgG, PEI HBsAg ad 1000 Standard, Anti-HBc-IgG (WHO) NIBSC 95/522, PEI Anti-HIV-IV) in zwei Konzentrationen (low level und high level) gespickt und getestet. Die Seren wurden nach Zentrifugation in drei Portionen geteilt und tiefgefroren gelagert. Die benötigten Vorverdünnungen der Standards erfolgten mittels infektionsserologisch negativ getesteter Blutspender-seren. Aliquot 1 der Originalprobe wurde ohne Zusatz getestet, Aliquot 2 wurde in geringer Menge nahe dem cut-off Wert (low-Standard) mit dem jeweils zu untersuchenden Antigen oder Antikörper gespickt. Aliquot 3 wurde, mit Ausnahme von Anti-HBc, in hoher Konzentration (high-Standard) mit dem zu untersuchenden Antigen oder Antikörper gespickt.

Die infektionsserologische Testung der prämortalen Blutproben ergab für alle Parameter (Anti-HIV 1/2, HBsAg, Anti-HBc und Anti-HCV) eindeutig negative Ergebnisse. Die Messungen der p.m. Proben ergaben folgende Ergebnisse:

Anti-HCV: Alle ungespickten Proben waren richtig negativ. Sowohl die mit dem low- als auch die mit dem high-Standard gespickten Proben waren Anti-HCV positiv. HBsAg: Alle ungespickten Proben waren richtig negativ. Sowohl die mit dem low- als auch die mit dem high-Standard gespickten Proben waren HBsAg positiv. Anti-HBc. Alle ungespickten Proben waren richtig negativ. Alle mit dem low-Standard gespickten Proben waren Anti-HBc positiv. Auf die Validierung eines high-Standard wurde in Rücksprache mit dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) verzichtet. Anti-HIV: Alle ungespickten Proben waren richtig negativ. Alle mit dem high-Standard gespickten Proben waren Anti-HIV positiv. Mit dem low-Standard waren 18/20 Proben falsch negativ und nur 2/20 Proben positiv. Es wurden weitere 10 p.m. Blutproben in einer Verdünnung von 1:4000 und 1:5000 gespickt und getestet. Alle Ergebnisse waren in dieser Messreihe positiv und die 1:4000 Verdünnung deutlich über dem cut-off Wert. Ursache der falsch negativen Messwerte im ersten Versuchsansatz war ein systematischer Pipettierfehler gewesen sein. Eine dritte Messreihe wurde mit 20 neuen p.m. Blutproben und einer Verdünnung von 1:5000 wiederholt. Diese 20 Blutproben waren zusammen mit den 10 Blutproben aus der Messreihe 2 bei 29/30 Proben (low-Standard) positiv. Eine von 30 Proben war falsch negativ. Ursache hierfür war mit hoher Wahrscheinlichkeit die unzureichende Qualität der präanalytischen Lagerung der Probe, welche unzentrifugiert als Vollblut bei 2-8°C aufbewahrt worden war.

Bei keinem der getesteten Parameter konnte ein Einfluss des p.m. Blutentnahmezeitpunktes, des Spenderalters oder des Spendergeschlechts auf das Ergebnis festgestellt werden. Serumproben sollten sofort nach der Blutentnahme zentrifugiert werden. Es gibt keine sicheren Hinweise dafür, dass post-mortem-Proben mit dem eingesetzten Testsystem zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen führen, wenn die Qualität der präanalytischen Bedingungen gewährleistet ist.

3.4. Kalus U, Wilkemeyer I, Pruss A, Caspari G. Validation of Serological Testing for Anti-Treponema pallidum from Postmortem Blood on the Siemens-BEP-III Automatic. Transfus Med Hemother 2013; accepted on April 30th (MS No. 201301012)

In der vorangestellten Studie (3.3) haben wir die Testung auf Anti-HIV-1/2, Anti-HCV, HBsAg and Anti-HBc aus postmortalem validiert. In dieser Arbeit untersuchten wir mit der Anti-Treponema-pallidum-Testung den letzten freigaberelevanten Infektionsparameter. Es wurden 17 p.m. Blutproben und je 10 Probenpaare (prä- und postmortem-Seren identer Hornhautspender) auf Antikörper gegen Treponema pallidum mit dem Siemens-BEP-III System getestet. Anschließend wurden die Blutproben mit zwei verschiedenen Antikörper-positiven Standardseren in zwei Konzentrationen gespikt (low und high Standard) und nach 0, 24 und 60 Stunden getestet. Zwei der p.m. Blutproben wurden vor dem Spiking falsch positiv gemessen. Diese Proben waren makroskopisch auffällig und durch starke Hämolyse (freies Hämoglobin > 50 mg/dL) belastet und konnten nicht gespikt werden. Die 25 negativen Proben wurden gespikt. Die Ergebnisse waren positiv in allen Proben. Daher können nicht hämolytische p.m. Proben mit dem verwendeten System auf Treponema pallidum getestet werden.

3.5. Gubbe K, Scharnagl Y, Grosch S, Tonn T, Schmidt M, Hourfarb KM, Karl A, Seifried E, Wilkemeyer I, Kalus U. Validation of Virus NAT for HIV, HCV, HBV and HAV. Transfus Med Hemother 2012; 39: 381–5

Kommerzielle NAT-Assays sind nicht für p.m. Blut lizenziert und müssen, ebenso wie inhouse-NAT Verfahren hierfür validiert werden. Um die Eignung von p.m. Blutproben für die NAT Testung zu untersuchen, wurden in diese Arbeit Blutprobenpaare von 32 Corneaspendern und 20 Blutproben von Blutspendern (20 Serum- und 20 Plasmaproben) eingeschlossen. Bei 8 Corneaspendern waren sowohl prä- als auch p.m. Blutproben vorhanden. Alle Blutproben waren serologisch negativ für Anti-HIV, Anti-HCV, HBsAg und Anti-HBc getestet. Alle Blutproben waren in der NAT negativ. Aliquots der Proben wurden darauf mit WHO-Standardverdünnungen für HIV, HCV, HBV und HAV gespikt und NAT getestet. Verglichen wurden die Ergebnisse in Abhängigkeit prä-mortale/postmortale, Serum/Plasma und der p.m. Entnahmezeit. Die analytische Sensitivität und Spezifität betragen bei der NAT-Testung jeweils 100%. Prä- und postmortale Proben unterschieden sich nicht signifikant bei den internen Kontrolle und nicht beim Messergebnis. Serum und Plasma eignen sich gleichermaßen als Untersuchungsmaterial. Hämolytische p.m. Proben und Proben mit einem Entnahmezeitpunkt >24 h p.m. ergaben gleichwertige Ergebnisse im Vergleich zu den prä-mortalen Blutproben. Das verwendete NAT-Verfahren ist auch für die Testung p.m. Serum- und Plasmaproben auf HAV, HBV, HCV und HIV geeignet.

4. Diskussion

Die Anzahl infizierter Menschen mit HIV, HCV, HBV und *Treponema pallidum* in der Welt ist gewaltig. Bis Ende des Jahres 2010 waren weltweit 35 Millionen Menschen mit dem Human Immundefizienz Virus (HIV) infiziert sind, hiervon leben 2,3 Millionen in Europa. Die Anzahl infizierter Menschen stieg in West- und Zentraleuropa von 600.000 im Jahr 2001 auf 800.000 im Jahr 2011, die Anzahl in Osteuropa und Zentralasien von 970.000 im Jahr 2001 auf 1,4 Millionen im Jahr 2011. Beide Regionen zusammen weisen 2011 Neuinfektionen in Höhe von etwa 170.000 Fällen (>450 täglich) auf. Weltweit versterben jährlich etwa 2 Millionen Menschen an dieser Krankheit. Durch neue Therapieformen konnten 2010 etwa 700.000 Todesfälle verhindert werden, so dass die Anzahl von HIV-Infizierten gestiegen ist, obwohl die Neuinfektionsrate von 1997 bis 2010 um etwa 20% fiel. [84].

Quantitativ am bedeutsamsten seitens der transfusionsmedizinisch relevanten viralen Infektionen ist die Hepatitis B. Nach WHO Angaben sind knapp ein Drittel der Weltbevölkerung (2 Milliarden) mit dem Hepatitis B Virus (HBV) infiziert. An einer chronischen HBV-Infektion leiden etwa 240 Millionen Menschen, von denen 600.000 an den Folgen jährlich versterben. Innerhalb Europas sind etwa 14 Millionen chronisch infiziert. Die HBV Prävalenz ist regional sehr unterschiedlich und reicht von 0,2% in Irland bis über 7% in Regionen der Türkei. Mit dem Hepatitis C Virus (HCV) sind weltweit etwa 150 Millionen Menschen chronisch infiziert, davon leben etwa 9 Millionen in Europa und mehr als 350.000 versterben jährlich an den Folgen [70]. Die HCV Prävalenz variiert von 0,4% in Schweden und Deutschland über 2-3% in den Mittelmeerländern bis hin zu über 20% in einer Region in Italien. Die Inzidenz ist in Europa in den letzten Jahren gestiegen.

Deutschland gehört mit einer Prävalenz von 0,6% für Hepatitis B und 0,4% für Hepatitis C in der Allgemeinbevölkerung zu den Niedrig-Prävalenzregionen. Risikogruppen wie i.v. Drogenabhängige und Migranten aus Hochprävalenzregionen sind hierbei jedoch unterschätzt. Das Wissen um eine Virushepatitis in der Bevölkerung ist unzureichend. In Surveys der European Liver Patient Association (ELPA) kannten bis zu 90% der Infizierten ihren Infektionsstatus nicht, 20% hatten noch nie von einer Virushepatitis gehört und 27% wussten nicht, dass sie ein hohes Risiko haben, die Infektion weiterzugeben [36].

Gemessen an diesen beeindruckenden Daten und Zahlen überrascht es, dass die Übertragung dieser Viren durch Organ- und Gewebetransplantate selten ist. Die Übertragung von HIV, HCV und HBV durch muskuloskelettales Gewebe zwischen den Jahren 1984 und 2010 ist nur in etwa 20 Fällen beschrieben. Dabei sind verschiedene Voraussetzungen für mögliche Transmissionen erfüllt.

1. Virales Genom von Infizierten ist auch in der Cornea, ein Gewebe mit hoher Infektionssicherheit bei Blut- und Lymphgefäßfreiheit, nachweisbar [44].

2. HIV bleibt p.m. für mindestens 21 Stunden nachweisbar [2] und mehrere Tage kultivierbar [22].
3. Die Durchseuchung von Gewebespendern im Vergleich zu Blutspendern ist um ein Mehrfaches erhöht beschrieben wurde [17,46,65,91].
4. Der Versuch einer sicheren Risikostratifizierung mittels Anamnese oder physikalischer Untersuchung mit der Möglichkeit des Ausschlusses von Hochrisikogewebespendern gelang nicht [88].

Aus diesen Gründen hat die infektionsserologische Testung eine überragende Bedeutung für die Gewährleistung von Sicherheitsstandards bei Gewebespenden. Die Testung ist auch in den Fällen - analog zur Plasmafraktionierung- zu fordern, in denen Ausgangsmaterial humanen Ursprungs in weiteren Herstellungsprozessen zum Arzneimittel durch Sterilisierungs- und Inaktivierungsschritte behandelt werden können [30]. Für Deutschland sind die erforderlichen Laboruntersuchungen in der TPG-GewV vorgeschrieben, die nach dem allgemeinen Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik anerkannt sein müssen. Diese Forderung führt zu Problemen, da im Allgemeinen die CE-gekennzeichneten infektionsserologischen Testsysteme zur Testung von p.m. Blut nicht validiert sind. Ein Umstieg auf solch validierte Systeme ist meist nicht möglich, da FDA lizenzierte Systeme in Europa nicht erhältlich sind/waren oder bereits durch neuere sensitivere Assays ersetzt sind [59]. Nach dem Tod kommt es zu Veränderungen des Blutes, wie z.B. Hämolyse, Autolyse oder bakterielles Wachstum [16,37]. Dies kann die Bestimmung von Infektionsmarkern erschweren und führt zu eventuellen unspezifischen Reaktionen und als Konsequenz zu falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnissen. Nach geltendem Recht (TPG-GewV) darf p.m. Blut, welches innerhalb von 24 h entnommen wurde, zur freigaberelevanten Testung von Gewebespendern verwendet werden.

Zukünftig ist die Übertragungswahrscheinlichkeit von Infektionen durch Gewebetransplantaten schon aufgrund der deutlich steigenden Transplantationshäufigkeit als zunehmend einzuschätzen. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeiten standen daher Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität von infektionsserologischen Untersuchungen (Anti-HIV, Anti-HCV, Anti-HBc, Anti-HBsAg, Antikörper gegen *Treponema pallidum*) und ergänzend die Testungen auf HIV-, HAV-, HBV- und HCV-Genom aus der Einzelspenderprobe mittels validierter Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) aus p.m. Blut. Die bisherigen Studien zur Testung von p.m. Blut wurden vorwiegend mit heute nicht mehr verwendeten Assays durchgeführt. Die kommerziellen infektionsserologischen Tests sind seit ihrer Einführung (Anti-HBsAg 1970, Anti-HCV 1989 und Anti-HIV-1 1985) in einem relevanten Maße weiterentwickelt worden sind und unterscheiden sich deutlich von ihren Vorgängerversionen. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Evolution der Testsysteme gegeben, um einen kritischen Vergleich unserer Ergebnisse mit früheren Studien zu ermöglichen.

Die Hepatitis B Testung von Blutspendern begann Anfang der 70er Jahre mit einem gelbasierten Test mittels Immunelektrophoresetechnik [23]. Bei einer typischen Hepatitis B (HBV) Infektion ist das HBsAg der erste HBV Marker und tritt in großem Übermaß auf, so dass der Nachweis auch mit Testen der 1. und 2. Generation gelingen konnte. In der Regel kann HBsAg bereits 2 bis 3 Wochen vor Krankheitsbeginn im Serum nachgewiesen werden und erreicht bei Auftreten der charakteristischen Krankheitssymptome (Ikterus, Anstieg der leberspezifischen Enzyme) einen Maximaltiter. Testsysteme der 3. Generation wurden bereits 1975 eingeführt und erreichten eine gesteigerte Spezifität durch Zusatz von konzentriertem Anti-HBs. Hierzu werden an eine Festphase HBsAg-Antikörper konjugiert. In einem nächsten Schritt wird zusammen mit der Probe z.B. biotinkonjugiertes Anti-HBs zugefügt und konkurriert um die Bindungsstellen der Antikörper beim Vorhandensein von HBsAg in der Probe. Eine Farbreaktion kann in einem zweiten Schritt nur in den Fällen erfolgen, in denen kein HBsAg aus der Probe an die Festphasen-Antikörpern gebunden hat. Diese Teste wiesen gegenüber der Immunelektrophoresetechnik eine etwa 10.000-fach höhere Sensitivität auf [24]. In der Mehrzahl werden heute monoklonale Antikörper zum Nachweis des HBsAg eingesetzt. Erfahrungen mit unterschiedlichen HBsAg-Testkits bei der Testung britischer Blutspender zeigten herstellereigenspezifische Raten falsch-positiver Befunde zwischen 0,01% und 0,18% [24]. Aufgrund des Auftretens von HBV Varianten als auch von low-carrier Trägern, welche mit den üblichen HBsAg-Testen nicht erkannt werden konnten, wurde die Pflichttestung der Hepatitis B um die Testung auf Antikörper gegen HBc (Anti-HBc) in Deutschland 2006 erweitert. Während HBsAg nach einer ausgeheilten Infektion nicht mehr nachweisbar ist, verbleibt Anti-HBc als „serologische Narbe“ lebenslang. Die genetische Variabilität von HBV ist groß, aktuell müssen 8 Mutanten in den Testen erkannt werden [50]. In einem Vergleich zwischen zwei verschiedenen HBsAg-Testen der Firma Abbott bei 6482 Blutspendern und 496 unselektierten Laborproben wurden Spezifitäten von 99,94% und 99,96% ermittelt. In einer wichtigen Arbeit zur Evaluation der Sensitivität der 17 gebräuchlichsten CE-zertifizierten HBsAg Assays Europas konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität in den letzten Jahren nicht weiter gesteigert werden konnte, der sensitivste Test ist bereits seit 1995 verfügbar. Das diagnostische Fenster zwischen dem sensitivsten und dem Test mit der geringsten Sensitivität betrug etwa 2 Wochen. Darüber hinaus hatten viele Assays Schwierigkeiten beim Nachweis von Mutanten [75]. Bei vier unterschiedlichen HBsAg Assays wurden Sensitivitäten zwischen 95,3% und 99,8% und Spezifitäten von 100% ermittelt [89]. Limitationen der Assays bei speziellen Vorerkrankungen zeigten sich bei einem Patienten mit einer hämatologisch-onkologischen Erkrankung und bei einem Patienten nach Nierentransplantation. Nach Reaktivierung einer okkulten Hepatitis B wurden die Patienten nur in 2 von 5 kommerziellen Anti-HBsAg Assays richtig positiv bestimmt [86].

Im Jahr 1990 wurde die 1. Generation von kommerziellen Anti-HCV Assays erhältlich. Diese

Testsysteme basierten auf den Nachweis einer HCV-Antigenkomponente, dem C100 der Nichtstrukturregion NS4. Bereits 1992 wurde eine 2. Generation durch die FDA lizenziert, bei denen weitere HCV-Antigene auch aus der NS3 Region eingesetzt wurden. Die deutliche Zunahme der Sensitivität zeigte sich bei positiv getesteten Blutspendern, die in der Kontrollmessung mit einem Test der 1. Generation nur in 61% bestätigt werden konnten [24]. Teste der 3. Generation sind seit 1993 verfügbar und enthalten in der Mehrzahl rekombinante bzw. synthetische Peptide der HCV-Antigenstrukturen core, NS3, NS4 und NS5. Damit konnte das diagnostische Fenster im Mittel um 5 Wochen gegen über der 2. Generation auf <10 Wochen nach Exposition verringert werden [42]. Retrospektive Untersuchungen zeigten, dass bestätigt positive Ergebnisse mit Testen der 3. Generation nur in 97% durch Teste der 2. Generation detektiert wurden [24]. Trotz dieser Verbesserungen werden weiterhin falsch negative, aber auch falsch positive Ergebnisse generiert. In einer Metaanalyse mit 10 Studien zur Spezifität und Sensitivität von Anti-HCV EIA's der 3. Generation bei Blutspendern wurde eine Sensitivität von 98,9% im Vergleich zur NAT-HCV Testung und eine Spezifität von 100% ermittelt [19]. Die Autoren beschreiben auch falsch positive Ergebnisse, im Besonderen bei Autoimmunerkrankungen, Lebererkrankungen und negativen Einflüssen der Präanalytik (Temperatur, Probenstandzeit). Eine andere Arbeitsgruppe verglich einem Test der 3. Generation (Ortho EIA-3.O, Fa Ortho Diagnostics) mit einem Test der 2. Generation desselben Herstellers (Ortho EIA-2.0) [85]. In dieser Studie wurden 203 Proben mit dem Ortho EIA-3.O und einem weiteren serologischen Ergänzungstest (RIBA) nachuntersucht, die im Ortho-EIA-2.0 initial positiv getestet worden waren. Der prädiktive Wert für einen Virusträgerstatus verbesserte sich von 0,23 für den Ortho EIA-2.0 auf 0,52 für den Ortho EIA-3.0. Die Zunahme der Spezifität konnte auf die Eliminierung von Fehlreaktionen mit spezifischen Antigenen zurückgeführt werden [85]. Das International Consortium for Blood Safety in Kooperation mit dem PEI veröffentlichte 2006 eine Evaluation von 44 Anti-HCV Assays [74]. Die Sensitivitäten betragen zwischen 99% und 100% und die Spezifitäten in 25 Assays (100%), in 11 Assays (99,45%) und 9 Assays hatten >2 falsch positive Befunde. Die Vergleichsuntersuchungen fanden mit spezifischen kommerziellen Panels an 200 Anti-HCV positiven Proben (ICBS HCV master panel) und 181 Anti-HCV negativen Proben (anti-HCV-negative ICBS master panel) statt. In einer weiteren Multizenterstudie wurden 1138 Blutspender, 3553 unselektierte Laborproben und Serokonversion-Panels mit verschiedenen kommerziellen Anti-HCV Assays parallel getestet. Die Autoren bestätigen die durchgehend hohe Qualität der unterschiedlichen Test Assays mit vergleichbaren Spezifitäten von >99,4% und fehlenden signifikanten Unterschieden in der Sensitivität bei den Serokonversion-Panels [1].

Anti-HIV Teste wurden 1985 in die Blutspenderdiagnostik eingeführt und verwendeten in der Mehrzahl ein virales Lysat, welches an einer Festphase konjugiert war. Dort bindende HIV-Antikörper aus der Probe konnten durch anti-human IgG Konjugat indirekt nachgewiesen

werden. Aufgrund von Qualitätsproblemen in der Herstellung der viralen Lysate wurden frühzeitig rekombinante oder auch synthetische virale Antigene mit der Festphase konjugiert. Hierdurch konnte eine verbesserte Sensitivität erreicht werden [21,23]. Im Jahr 1991 wurde erstmalig ein kombinierter Anti-HIV $\frac{1}{2}$ -p24-Ag EIA Test lizenziert. Eine dritte Testgeneration wurde 1991 eingeführt und verwendete rekombinante und synthetische Antigene im Sandwich-Verfahren. Hierbei bindet an die Festphase gebundenes Antigen mögliche Antikörper aus der Probe. In einem nächsten Schritt wird enzym-konjugiertes Antigen zugefügt, welches an den Antikörper anbinden kann, wenn er Festphasen-Antigen-gebunden ist. Dadurch entsteht ein Komplex aus Antigen-Antikörper-enzymkonjugiertes Antigen. Mit dieser Technik war eine >20-fache Steigerung der Sensitivität gegenüber Testsystemen der 2. Generation [23] zu erzielen. Eine 4. Testgeneration kombiniert die Detektion von Antikörper und Antigen (p24 Ag) und wurde im Jahr 2000 in Europa eingeführt und kann das diagnostische Fenster weiter verkürzen [55]. Direkt nach deren Einführung wurden gegenüber den un kombinierten Antikörpersuchtesten verminderte Sensitivitäten beschrieben, die bei den aktuellen Testsystemen nicht weiter bestätigt werden. Eine weitere Steigerung der Sensitivität serologische Teste scheint aus immunologischer Sicht nicht möglich zu sein.

Frühzeitig nach Einführung infektionsserologischer Test Assays wurde auch die Möglichkeit der Testung von p.m. Blut beschrieben [41,64]. Nur in einer Arbeit wurden dabei prä- und p.m. Blutproben derselben Spender verglichen [37]. Bei dieser Untersuchung an gematchten Blutproben von Corneaspendern mit 33 prä-mortalen versus 33 p.m. Proben identer Spender wurde eine Diskrepanzquote von 51,5% festgestellt. In den 17 Fällen mit diskrepanten Ergebnissen war die p.m. Testung von Anti-HBsAg in 16/33 Fällen mit einem falsch positiven Ergebnis betroffen und in 1/33 Fällen wurde Anti-HCV p.m. falsch negativ bestimmt. Mittels NAT konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass diese Probe prä-mortale Anti-HCV positiv gewesen war. Bei der Anti-HIV $\frac{1}{2}$ Testung kam es in dieser Arbeit in zwei Fällen zu einem falsch positiven p.m. Ergebnis. Die Autoren resümieren, dass eine Serokonversion zwischen den prä- und postmortalen Entnahmezeitpunkten bei einem Zeitversatz von durchschnittlich nur 3,9 Tagen ausgeschlossen war und begründet die hohe Rate an falsch positiven Befunden bei der Anti-HBsAg Testung mit Interferenzen zwischen Testsystem und Hämolyse und der daraus resultierenden unzureichenden Spezifität. Eine Limitation der Studie ist darin begründet, dass bei der Anti-HBsAg Testung nur der Test eines Herstellers eingesetzt wurde. Der wichtige Aspekt zum Zeitfenster und zu den Lagerbedingungen der Proben zwischen p.m. Entnahme und Messung wird in dieser Publikation nicht weiter beschrieben.

In einer initialen retrospektiven Arbeit verglichen wir ebenfalls die infektionsserologische Testung gepaarter prä- und postmortaler Blutproben von 487 Corneaspendern [Wilkemeyer 2012]. Die Entnahme der prä-mortalen Proben erfolgte innerhalb von maximal 7 Tagen vor Eintritt des Todes. Die Messungen erfolgten an zwei unterschiedlichen automatisierten Sys-

temen unter Routinebedingungen mittels den zugehörigen CE-zertifizierten EIA-Testen. Es kam in insgesamt 21 Fällen (4,3%) zu Diskrepanzen, davon in 0,8% prä mortal positiv und p.m. negativ und in 3,5% prä mortal negativ und p.m. positiv. Es traten Diskrepanzen in 17 Fällen bei Blutproben auf, die in einem Zeitrahmen von >24 Stunden (13 p.m. positiv, 4 p.m. negativ) und in 4 Fällen bei Proben, die \leq 24 Stunden (4 p.m. positiv, 0 p.m. negativ) postmortal entnommen worden waren. Die Mehrzahl der Diskrepanzen (7 Spender (1,4 %)) betraf die Anti-HBsAg Testung und bestätigt diese bekannte Problematik aus einer früheren Arbeit [37]. Von diesen 7 Spendern wurde dreimalig die prä mortale Blutprobe positiv und die p.m. Probe negativ getestet. Eine anschließende HBV-PCR konnte nicht durchgeführt werden, da kein postmortales Blut mehr vorhanden war. Bei 4 Spendern wurde die prä mortale Probe negativ und die postmortale positiv getestet. In 2 Fällen konnten Ergänzungsteste mit der NAT-HBV durchgeführt werden, die negative Befunde ergaben. Bei der Anti-HCV-Testung trat eine weitere Diskrepanz mit negativem p.m. Ergebnis auf. Auch hier konnte eine NAT-HCV nicht durchgeführt werden, da kein p.m. Material mehr verfügbar war. Insgesamt 8 Diskrepanzen (1,6%) traten bei der Testung auf Anti-HBs, Anti-HBc IgG+IgM und Anti-HIV 1/2 auf. Alle Proben waren prä mortal negativ und postmortal positiv. Bei 5 Spendern (1,0 %) wurden abweichende Ergebnisse in der Treponema pallidum Testung festgestellt. Alle Proben waren prä mortal negativ und postmortal positiv. Keiner der 5 positiven Befunde konnte in einer Ergänzungstestung bestätigt werden. Unsere Arbeit zeigt damit deutlich weniger Diskrepanzen, als sie in einer früheren Studie beschrieben worden sind [37]. Diese Autoren benutzten bei ihrer Studie einen Anti-HBsAg Assay, der nicht mehr aktuell ist und bereits mehrmals durch Nachfolgeversionen ersetzt wurde. Es ist bekannt, dass die Spezifitäten der Testsysteme in der Zwischenzeit durch Weiterentwicklungen verbessert wurden, sich aber zwischen verschiedenen Herstellern unterscheiden. Diese herstellerspezifischen Unterschiede untersuchte eine Arbeitsgruppe mittels deutlich hämolytischen p.m. Blutproben, die auf Anti-HBsAg und Anti-HIV $\frac{1}{2}$ parallel mit jeweils zwei unterschiedlichen Testkits der Firmen Abbott Laboratories (North Chicago, USA) und Genetic Systems, Seattle, USA bzw. Retrovirology Coulter Corporation, USA) gemessen wurden [56]. Bei der Testung von 43 hämolytischen Proben zeigten sich unspezifische Anti-HBsAg Ergebnisse in 67,4% bei Abbott Laboratories aber lediglich in 4,7% bei Genetic Systems, und bei 31 hämolytischen Seren zeigten sich unspezifische Anti-HIV Ergebnisse in 83,9% bei Abbott Laboratories und in 3,2% bei Beckman Coulter, (USA). Eine verminderte Spezifität bei der Testung auf Anti-HBsAg in p.m. Blut wurde bereits zuvor beschrieben [63]. Die Spezifität des eingesetzten EIA der Firma Abbott Laboratories betrug bei 409 Proben (81,3%) im Vergleich zu einem Radioimmunsay, welcher als Referenztest eingestuft wurde. Die Rate an falsch positiven Ergebnissen war abhängig von der Hämolyse und schwankte zwischen 7% bei nichthämolytischen und 50% bei hämolytischen Proben. Untersucht wurden in dieser Arbeit auch Verstorbene mit

bekannter Aids-Erkrankung. 34/35 wurden Anti-HIV positiv getestet, ein Proband war bei drei verschiedenen EIA-Assays negativ und ausschließlich in einem Western Blot Test positiv. Weitere Autoren beschrieben Unzulänglichkeiten der Anti-HIV Testung aus p.m. Proben. Eine Arbeitsgruppe untersuchte 94 Leichenspenden auf Anti-HIV, denen prä mortal, unmittelbar postmortal und nach >24 h Proben entnommen worden waren. Postmortal sank die Spezifität auf 94% und nach >24 h auf 81% ab [11]. Eine weitere Arbeitsgruppe fand im Vergleich eines kommerziellen Anti-HCV EIA (HCV-EIA 2.0) mit seinem Vorgängertest (HCV-EIA 1.0) der Firma Abbott Laboratories bei der Messung von 101 p.m. Blutproben gleiche Sensitivitäten von 100%, aber eine Erhöhung der Spezifität von 84% auf 92,7% für den HCV-EIA 2.0 zeigen [43]. In einer zusätzlich durchgeführten Verdünnungsreihe zeigten sich keine Unterschiede in den cut-off Werten zwischen prä- und postmortalen Proben, welche mit HCV-positivem Serum gespikkt wurden. Neben diesen möglichen hersteller- und testspezifischen Unterschieden bei p.m. Blut fanden andere Autoren weitere relevante Einflussgrößen. In einer Befragung zur Reproduzierbarkeit der virologischen Testung aus p.m. Blut zeigten 5499 infektionsserologische Untersuchungen bei 1833 Gewebespendern in 12 britischen Gewebebanken eine große Streuung wiederholt positiver Befunde von 0-42% [79]. Hohe Wiederholungsraten korrelierten nicht mit den Erregern sondern mit den Gewebebanken. Insgesamt wurden 6,3% der Spender wiederholt positiv getestet, 71% davon betrafen die HBsAg Testung. In der Arbeit wird die Bedeutung einer unterschiedlichen präanalytischen Probenbearbeitung hervorgehoben. Die beiden Gewebebanken mit der höchsten Rate an Wiederholungstestungen hatten Proben bis zu 72 h p.m. entnommen, andere Gewebebanken fanden keine Assoziation zwischen der Rate positiver Befunde und einem p.m. Entnahmezeitpunkt. Nach Verkürzung ihres Probenentnahmezeitpunktes ≤ 24 h p.m., konnte eine große Gewebebank die Raten positiver Befunde von 14% auf 3,5% senken. Diese Daten zeigten das verstärkte Auftreten falsch positiver Ergebnisse in Abhängigkeit von dem Entnahmezeitpunkt p.m. Proben und wurden durch eine spätere Arbeit bestätigt [16]. Diese französische Arbeitsgruppe untersuchte 553 p.m. Proben von Corneaspendedern auf Anti-HIV, Anti-HBsAg und Anti-HCV und wertete die Testergebnisse in Abhängigkeit von der makroskopisch sichtbaren Probenqualität als auch deren Abhängigkeit von dem Einfluss der p.m. Entnahmezeit aus. Die Proben waren in 21,5% infektionsserologisch auffällig und in 46% makroskopisch auffällig. Zwischen makroskopischer Auffälligkeit und der Rate an positiven Testergebnissen zeigte sich eine signifikante Korrelation für Anti-HIV und Anti-HBsAg, aber nicht für Anti-HCV. Eine Nachtestung war in 15,6% bei makroskopisch unauffälligen Proben und in 49,6% bei makroskopisch auffälligen Proben notwendig. Auffällige Proben wurden in 25% bei einer p.m. Entnahme <12 h und in 54,5% bei einer p.m. Entnahme >36 h gefunden. Diese Arbeit untersuchte erstmalig detailliert die Auswirkungen präanalytischer Einflüsse bei der Testung von p.m. Proben. Eine Limitation liegt in der fehlenden Erklärung

der makroskopischen Auffälligkeit mit zunehmendem Zeitintervall, da nicht dieselben Proben zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen worden sind. Die Proben wurden nach Eingang im Labor standardisiert und umgehend zentrifugiert und innerhalb von 48 h mit Test Assays der 3. Generation gemessen. Da jedoch keine Aussagen zu den Lagerungsbedingungen der Leichname vor Probenentnahme gemacht werden, können neben dem Faktor Zeit weitere Einflussgrößen auf mögliche Unterschiede der präanalytischen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden. Die Empfehlung der Autoren zur Begrenzung der Probenentnahme <12 h p.m. würde zu einem zusätzlichen Verlust von potentiellen Organ- und Gewebespendern führen. In der Literatur überwiegen falsch positive Ergebnisse aus p.m. Blutproben zahlenmäßig falsch negative Ergebnisse deutlich, falsch negative Ergebnisse gefährden jedoch die Empfängersicherheit. In unserer Studie hatten wir insgesamt 4 falsch negative Ergebnisse (3 Anti-HBsAg und 1 Anti-HCV), da das prämortale Ergebnis als Referenz galt. Da eine NAT nicht durchgeführt werden konnte und wir bei den prämortalen Proben ein anderes Testsystem als bei den p.m. Proben verwendet haben, verbleibt unklar, ob die Diskrepanzen nur definitionsgemäß durch falsch negative p.m. Ergebnis auftraten oder aber die prämortalen Proben falsch positiv getestet wurde. Eigene Erfahrungen im Routinebetrieb und bei der Erstvalidierung nach Inbetriebnahme hatten bereits die Empfindlichkeit unseres Testsystems auf Probenqualität und -material gezeigt. Mit unserem System in der Routinediagnostik auffällig getestet Proben werden in der Ergänzungstestung mit weiteren Testsystemen in weniger als 50% bei Anti-HBsAg bestätigt (eigene Erfahrungen). Wir halten es aus diesen Gründen für möglich, dass die negativen HBsAg Befunde p.m. richtig negativ getestet worden sind. Eine mögliche Hämodilution durch prämortale Infusionen und Transfusionen als mögliche Ursache eines p.m. falsch negativen Ergebnisses sehen wir kritisch. Heim et al. hatten in ihrer Publikation diese Möglichkeit für das falsch negative Anti-HCV Ergebnis bei einer Probe aufgeführt. Verschiedene Autoren haben eine Hämodilution als Ursache einer möglichen Abnahme der Sensitivität p.m. Proben untersucht. Eastlund beschreibt in seiner Übersichtarbeit, dass >45% der Gewebespende prä mortal kristalline und kolloidale Lösungen und Blutprodukte erhalten [26]. Der Autor führte Verdünnungsreihen mit p.m. Serumproben bekannter positiver Gewebespende durch und konnte eine große Robustheit der Testergebnisse in Abhängigkeit einer Verdünnung aufzeigen. HBsAg unterschritt die Nachweisgrenze bei einer Verdünnung >1:360.000, Anti-HIV >1:20.0000 und Anti-HCV >1:16. Andere Autoren stützen diese Robustheit gegenüber Verdünnungseffekten mit ihren Arbeiten [3,45,54]. Auch im Paarvergleich prä-/postmortal konnte die Robustheit der Anti-HCV-Testung demonstriert werden. Bis zu einer Verdünnung von 1:512 wurden die Proben positiv getestet, obwohl die cut-off Werte ab einer Verdünnung von <1:64 abnahmen [43]. 1987 wurde jedoch der Fall einer HIV-Übertragung durch die Transplantation eines Organs publiziert, die durch ein falsch negatives Testergebnis bedingt war [12]. Die Ursache musste auf eine massive Hä-

modulation des Spenders zurückgeführt werden. Die Probe war umgehend nach einer Massivtransfusion (2-3fache des eigenen Blutvolumens über 11 Stunden) entnommen worden und führte zu einem negativen Testergebnis. 48 h später wurde eine zweite Probe entnommen, welche Anti-HIV positiv war. Es wurde vermutet, dass die Anti-HIV Antikörper durch die Massivtransfusion aus dem intravaskulären in den extravaskulären Raum gespült wurden und erst nach der anschließenden p.m. Rückdiffusion zurück in den intravaskulären Raum wieder der Probenentnahme zugänglich geworden sind.

Unsere vergleichende Untersuchung von 487- prä- und postmortal gemachten Blutproben im Kontext mit der besprochenen Literatur zeigt, dass

1. die scheinbar sehr vergleichbaren Daten zu Sensitivität und Spezifität von verschiedenen infektionsserologischen Testen nicht unkritisch auf p.m. Blut übertragen werden können,
2. im Vergleich zu den früheren Studien wir deutlich weniger falsch positive Befunde, insbesondere bei der HBsAg Testung, erheben, welche jedoch auch in dieser Studie die häufigsten Diskrepanzen verursachte,
3. möglicherweise falsch negative Befunde im p.m. Blut auftreten können.

Da keine Arbeit bisher den Verlauf der infektionsserologischen Testung derselben p.m. Proben zu verschiedenen Zeitpunkten beschreibt, ist eine sichere Aussage zur Stabilität von Antikörpern und Antigenen nicht möglich. Daher haben wir eine Untersuchung in Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg (UKE) durchgeführt. Eingeschlossen wurden Verstorbene mit gesicherter oder sehr wahrscheinlicher HIV- und/oder, HBV- und/oder HCV-Infektion oder gesichertem Hinweis auf einen positiven infektionsserologischen Befund. Die Verstorbenen wurden während des gesamten Untersuchungszeitraumes bei +7 bis +9°C gelagert. Die Blutentnahmen erfolgten nach Einlieferung und nach 12, 24, 36 und 48 Stunden. Die Proben wurden umgehend zentrifugiert, ein Teil des Serums wurde danach bei +2 bis +6°C gelagert und innerhalb von 12 Stunden mittels EIA-Teste gemessen. Bei den untersuchten Parametern waren sämtliche Testergebnisse bis zu 48 Stunden p.m. korrekt positiv bestimmt worden. In dieser Arbeit untersuchten wir damit erstmalig mögliche p.m. Veränderungen infektionsserologischer Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten. Bereits andere Autoren konnten bestätigen, dass der Nachweis von HIV-Antikörpern in p.m. Blut noch nach 35 h bzw. nach 5 Tagen gelingen kann [41,64]. Unsere Studie belegt die hohe Stabilität der untersuchten Antikörper und Antigene im Leichnam bis zu 48 h postmortal. Alle Probanden wurden unverzüglich und durchgehend kühlend gelagert, die Blutentnahme war standardisiert und die Zentrifugation der Proben erfolgte unmittelbar nach Entnahme. Auf diese Weise konnten wir eine hohe Probenqualität erreichen, welche die erreichten Spezifitäten und Sensitivitäten mit zwei unterschiedlichen Testsystemen erklären kann. Damit unterscheiden sich unsere Resultate deutlich von den Ergebnissen einer bereits zitierten französischen Arbeitsgruppe [16]. Diese

Autoren beschreiben zwar keine signifikante Korrelation zwischen der Rate positiver Befunde und dem Entnahmezeitpunkt, aber eine Korrelation zwischen falsch positiven Befunde und der Probenqualität, welche mit zunehmendem p.m. Entnahmezeitpunkt deutlich abnahm. Autolytische und hämolytische Prozesse oder auch ein bakterielles Wachstum können durch konsequentes Vermeiden einer Unterbrechung der Kühlkette verringert werden. Nach 36 h und zunehmend nach 48 h zeigten jedoch auch unsere Proben Zeichen einer Hämolyse. Eine Quantifizierung der Hämolyse in den p.m. Proben ist zwischen den verschiedenen Arbeiten aufgrund einer fehlenden Bestimmung des freien Hämoglobins nicht möglich. In beiden Studien wurden aktuelle und weitverbreitete Testsysteme eingesetzt worden. Dass Auftreten testspezifischer Unterschiede zeigte sich in auch unserer Arbeit bei der Anti-HBc Testung. Bei 5/32 Bestimmungen, die im Abbott System positiv waren, wurden mit Siemens negative Befunde ermittelt. Hiervon wurden ein Proband 3-malig und ein Proband 2-malig diskrepant gemessen. Beide Probanden hatten im EIA der Firma Abbott eine schwächere Reaktivität als die weiteren Anti-HBc positiven Probanden. Die Stabilitäten der Antikörper und des HBsAg bis 48 h p.m. waren Voraussetzung und daher wegbereitend für weitere Untersuchungen, mit denen die gesetzlichen Vorgaben zur Validierung eines Testsystems für p.m. Blut erfüllt werden sollten. Diese werden durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) als national zuständige Behörde für Gewebezubereitungen gefordert. Hierzu haben wir prä- und postmortale Seren von 20 Hornhautspendern, die negativ auf Anti-HIV-1/2, Anti-HCV, Anti-HBsAg und Anti-HBc getestet waren, mit Referenzstandards niedriger und hoher Konzentration gespikt und danach getestet. Die p.m. Proben waren im Zeitraum zwischen 4 h und 52 h p.m. entnommen worden. Bei Anti-HCV und Anti-HBc waren 20/20 ungespikten Proben negativ und 20/20 gespikten Proben positiv, bei Anti-HBsAg trat in 1/20 Probe (low Standard) ein falsch negatives Ergebnis auf, welches auf einen Pipettierfehler zurückgeführt werden konnte. Seitens der Anti-HIV Testung traten technische Schwierigkeiten auf, da durch einen systematischen Pipettierfehler die zugesetzte Menge an Referenzserum zu gering und aufgrund der zu großen Endverdünnung die Proben negativ getestet wurden. Bei der Nachtestung wurden 10 Proben unmittelbar nach der Blutentnahme zentrifugiert und tiefgefroren, 10 Proben wurden als Vollblut maximal 7 Tage im Kühlschrank bei +2 bis +8°C aufbewahrt und erst vor der Analytik zentrifugiert. Die cut-off Werte der unmittelbar zentrifugierten Proben waren deutlich positiver als bei den Proben, die unzentrifugiert gelagert worden waren. Bei diesen Proben wurde auch ein falsch negatives Ergebnis ermittelt. In dieser Studie wurden p.m. Proben erstmalig mit Referenzstandards gespikt und prospektiv untersucht. Abweichend von anderen Autoren fanden wir keine Unterschiede in Abhängigkeit von der p.m. Probenentnahmezeit bzw. von Alter und Geschlecht, die andere Autoren beschrieben haben [17,63]. Dies gilt für die infektionsserologischen Endergebnisse, aber auch für die ermittelten Rohwerte bzw. cut-off Werte, die sich nicht signifikant mit zunehmender p.m. Entnahmezeit

veränderten. Wir fanden jedoch ein falsch negatives Ergebnis und eine signifikante Änderung der cut-off Werte in Abhängigkeit von der Probenqualität. Diese ist abhängig von einer unverzüglichen Zentrifugation des p.m. Blutes. Die Lagerung als Vollblut führte zu einem falsch negativen Anti-HIV Ergebnis. Neben der Beeinflussung der EIA durch die Probenqualität müssen auch direkte Inhibitionseffekte in Erwägung gezogen werden. Diese können bei unzureichenden Lagerbedingungen zunehmen und zu falsch negativen Testergebnissen führen.

Die Testung auf *Treponema pallidum* ist eine weitere freigaberelevante Pflichttestung für Gewebespende. Die Übertragung der von *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* verursachten Syphilis durch eine Bluttransfusion wurde erstmals 1915 beschrieben [31]. Seitdem wurden mehr als 200 Fälle von transfusionsbedingter Syphilis publiziert, in den letzten 30 bis 40 Jahren wurde nur noch vereinzelt über Fälle von Transfusions-syphilis berichtet [90]. In mehreren westeuropäischen Ländern steigen Syphiliserkrankungen aktuell an. Dies wird mit einer Zunahme von riskantem Sexualverhalten (MSM) erklärt [71]. Unser EIA auf der Basis rekombinanter *Treponema pallidum* Antigene eignet sich zum Antikörpernachweis, ist aber nicht für p.m. Blut validiert. Wir haben 17 p.m. Proben und je 10 prä- und postmortale gematchte Blutproben identer Corneaspende mit zwei unterschiedlichen Referenzseren gespikt, die Antikörper gegen *Treponema pallidum* enthalten. In Verdünnungsreihen ermittelten wir die spezifischen Verdünnungen für ein high- und ein low-Standard Spiking. Alle p.m. Proben wurden unmittelbar nach Spiking, nach 24 h und nach 60 h positiv bestimmt. Die Entnahmezeiten lagen zwischen 12 und 54 h postmortal. Bei weiteren 10 Spendern konnten gepaarte prä- und p.m. Proben verglichen werden. Ungespikt wurden alle prä-mortale Proben negativ aber 2/10 p.m. Proben positiv bestimmt. Beide Proben zeigten ausgeprägte makroskopische Auffälligkeiten, das freie Hämoglobin war mit 50 mg/dl und mit 95 mg/dl deutlich erhöht. Diese Proben wurden aus der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Die Entnahmezeiten der hämolytischen Proben betragen 26 h bzw. 48 h. Proben ohne Hämolyse wurden bis 58 h p.m. entnommen. In den verbliebenen 8 Proben zeigten sich nach Spiking in allen Fällen mit beiden Referenzseren nach 24 h und nach 60 h positive Ergebnisse. Korrelationen zwischen den Extinktionswerten und der Entnahmezeit, dem Alter oder dem Geschlecht zeigten sich nicht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein Antikörpernachweis gegen das Bakterium *Treponema pallidum* aus p.m. Blut mit einer Sensitivität von 100% gelang und mögliche Inhibitionseinflüsse über 60 h zu keinem falsch negativen Ergebnis geführt haben. Sie sind vergleichbar mit unseren Untersuchungen zur infektionsserologischen Testung auf virale Erreger. Eine entscheidende Einflussgröße zur Validität der Messergebnisse lag nicht in der p.m. Entnahmezeit, sondern die Probenqualität begründet. Diese kann bei korrekter Kühlung der Spende und einer möglichst umgehenden Zentrifugation nach Entnahme auch >48 h p.m. erreicht werden. Ausgeprägte Hämolyse führte zu falsch positiven Befunden. In

der Testkitbeilage wird durch Siemens ein Einfluss von Hämolyse, Lipämie und Ikterus verneint. Eine Nachfrage ergab, dass zu dieser Aussage keine validen Untersuchungen vorgelegt werden können (persönliche Mitteilung). Die Syphilis wird nahezu ausschließlich durch sexuelle Kontakte übertragen und daher auch als Surrogatmarker für Risikoverhalten eingestuft. Im Jahr 2001 waren nach den Meldungen an das Robert Koch-Institut in Deutschland 33 von 100.000 Erstspendern bestätigt positiv. Der Arbeitskreis Blut, ein Expertengremium, das die zuständigen Behörden des Bundes und der Länder in Fragen der Sicherheit bei der Gewinnung und Anwendung von Blut und Blutprodukten berät, kam in 2002 zu der Schlussbewertung, dass auf ein Spenderscreening nicht verzichtet werden kann, obwohl in Deutschland seit mehr als zwei Jahrzehnten kein Fall einer Transfusions-syphilis bekannt wurde. Die Gründe liegen in der hohen Infektiosität des Erregers und der zunehmenden Inzidenz der Erkrankung. In einem Vergleich der Prävalenz zwischen Bluterst Spendern und Gewebespendern in Schottland wurden höhere Prävalenzen für HBV (4-fach), HCV (1,6-fach) und Syphilis (34-fach) bei Organ- und Gewebespendern in Vergleich zu Bluterst Spendern gefunden [33]. Übertragungen von Bakterien durch Gewebetransplantate sind beschrieben, jedoch nicht für *Treponema pallidum*. Kürzlich wurde jedoch eine Übertragung durch eine Lebertransplantation bekannt [81]. Treponemen sind relativ instabil, wobei insbesondere wärmeempfindliche Lagerung unter +20 ° C für mehr als 72 Stunden zu irreparablen Schäden führt. Eine kritische Neubewertung dieser Pflichttestung sollte daher für Gewebespenden erfolgen, zumindest für muskuloskelettales Gewebe, welches Inaktivierungs- und Sterilisierungsschritten unterworfen wird. Für Plasma ausschließlich zur Fraktionierung wird gemäß der Hämotherapie-Richtlinie der Bundesärztekammer (BÄK) keine Syphilis-Testung mehr vorgeschrieben.

Die Verkürzung der diagnostischen Fenster durch die NAT-Testung ist auch geeignet, die Sicherheit von Gewebe- und Organspenden zu erhöhen, da ein Genomnachweis auch in serologisch negativen Organ- und Gewebespendern gelingen kann [17]. In den USA trat in 2002 bei einem Empfänger einer Patellarsehne und eines Knochentransplantat 6 Wochen nach Transplantation eine akute symptomatische Hepatitis C Infektion auf. Der Spender war Anti-HCV negativ gewesen. Im Empfänger-Look-Back Verfahren konnte mit der NAT-HCV Testung seiner Rückstellprobe die HCV Infektion nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 8 Empfänger von Organ- und Gewebetransplantaten infiziert [83]. Die PCR Testung in p.m. Blut ist jedoch durch mögliche Inhibitionseffekte erschwert [11]. Die Autoren untersuchten Proben von HIV-Infizierten prä- und postmortal (<24 h und > 24 h). Die Sensitivität sank auf 68% (<24 h p.m.) und 55% (>24 h p.m.). Die Gründe für das Versagen der Amplifikation konnten die Autoren nicht klären. Wir validierten unsere NAT-Testung mit insgesamt 32 Proben von Corneaspendern und 40 Kontrollseren von Blutspendern, die serologisch Anti-HIV ½, Anti-HCV, Anti-HBsAg negativ waren. Bei 8/32 p.m. Proben standen zusätzlich gepaarte

prämortale Blutproben zur Verfügung. Die Proben wurden initial mittels NAT getestet und anschließend mit WHO-NAT Standardseren gespikkt. Die anschließend durchgeführte Testung zeigte bei alle ungespikkten Proben negative und bei allen gespikkten Proben positive Ergebnisse. Die analytische Sensitivität und Spezifität betragen daher 100%. Die Schwellenwerte der internen Kontrolle und der Messungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den prä- und den post mortem Proben. Auch beim Vergleich Serum gegen Plasma zeigten sich keine Unterschiede. Makroskopisch auffällige (hämolytische) p.m. Proben und Proben mit einer Entnahmezeit >24 h p.m. ergaben gleichwertige Ergebnisse im Vergleich zu den prämortalen Proben. Das von uns validierte NAT-Verfahren ist damit geeignet, die Messung auf HAV, HBV, HCV und HIV auch aus p.m. Serum- oder Plasma valide zu gewährleisten. In einer früheren Arbeit wurde bereits die NAT-HIV und die NAT-HCV Testung mit der infektionsserologischen Testung bei Organspendern (n=113) und Corneaspendern (n=368) verglichen [52]. Die Entnahme des Blutes erfolgte bei herzkreislaufstabilen Organspendern und bei Corneaspendern bis zu 48 h postmortal. Im Spenderblut von zwei Anti-HCV positiven Organspendern konnte HCV-Genom bestätigt werden und bei 107 Anti-HCV und Anti-HIV serologisch negativen Organspendern zeigten sich auch in der NAT keine positiven oder grenzwertigen Befunde. Im p.m. Blut der 368 Corneaspenden war die Rate von grenzwertigen NAT-Ergebnissen für HIV-RNA (7,1%) und für HCV-RNA (14,4%) jedoch deutlich erhöht. Falsch negative Ergebnisse wurden durch eine mitgeführte interne Kontrolle ausgeschlossen. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass eine Inhibition der Amplifikation durch Hämolyse, Heparin, Bilirubin oder Dextrane, die zuvor beschrieben war, durch Modifikationen der NAT besser eliminiert werden konnte, aber weitere technische Verbesserungen notwendig sind. Weitere Arbeiten untersuchten die Spezifität und Sensitivität der NAT in p.m. Blut [60]. Bei 36 p.m. Proben (mittlerer Entnahmezeitpunkt 2,5 Tage) wurden mit der NAT-HCV bei 20 Anti-HCV positiven Proben in allen Fällen positive und bei 16 Anti-HCV-negativen Proben in allen Fällen negative Ergebnisse ermittelt. Zur Validierung der Sensitivität wurde bei den Anti-HCV-negativen Proben ein zweites Aliquot als Duplikat mitgeführt, welches mit HCV-RNA gespikkt worden war. Hier zeigten sich bei 6/10 Proben in der NAT-HCV (falsch) negative Ergebnisse. Die Autoren führten dies auf Inhibitionseffekte durch bakterielle DNAasen und RNAasen zurück. Das Problem der Inhibition konnte im weiteren Studienverlauf in 3/6 Fällen durch eine 1:5 Verdünnung der Probe und in allen Fällen durch eine Vorbehandlung der Probe mit einer speziellen Matrix verhindert werden. Diese Matrix absorbiert DNA-Bruchstücke und PCR-Inhibitoren und war konnte die NAT-Testung in p.m. Blut valide gewährleisten [60]. Die NAT-Testung erlaubt jedoch nicht, auf eine serologische Untersuchung verzichten zu können. Es sind Fälle von Befundkonstellationen einer negativen NAT in Kombination mit einem positiven serologischen Ergebnis aufgetreten, in denen ein Spender einen Virus stark eliminiert hat oder ein spezieller Genotyp durch eine NAT nicht

detektiert wurde. Mögliche Limitationen wurden kürzlich bei der NAT-HIV festgestellt, als ein Subtyp nicht erkannt worden ist [18].

Mit den vorgelegten Arbeiten haben wir das Ziel verfolgt, die gesetzlich vorgeschriebenen Testungen auf Infektionskrankheiten bei Gewebespendern hinsichtlich ihrer Eignung auch aus p.m. Blut zu validieren. Aufgrund der von uns durchgeführten Untersuchungen wurde uns als erste universitäre Einrichtung in Deutschland von der Bundesoberbehörde (PEI) und den zuständigen Landesbehörden die Erlaubnis nach § 20b AMG in Verbindung mit einer Genehmigung nach § 21a AMG zur Testung aus p.m. Blut erteilt. Das beschriebene Vorgehen dient weiteren Gewebebanken als Vorlage zur Validierung der p.m. Testung im Rahmen der Anträge auf eine Herstellungserlaubnis. Das Wissen zu diesem Themenkomplex stammte bisher nur von wenigen Studien, die in der Mehrzahl Jahre zurücklagen. In diesen Studien wurde die mangelnde Spezifität, aber auch die verringerte Sensitivität bei der infektionsserologischen Testung von p.m. Proben bemängelt. Eine mangelnde Spezifität führt zu einem unnötigen Verwurf knapper Gewebetransplantate, eine unzureichende Sensitivität zur Gefährdung des Empfängers durch falsch negative Befunde. Letztendlich ist eine 100%-Sicherheit bei einem humanen Ausgangsmaterial nicht zu erreichen. Dazu ist die Evolution zu dynamisch, neue Serotypen können sich der Nachweisbarkeit durch gängige Testmethoden entziehen und auch mittels NAT-Technik ist ein diagnostisches Fenster von noch wenigen Tagen nicht lückenlos zu schließen. Neben diesen methodischen Limitationen kommt mögliches menschliches Versagen hinzu, wie der kürzlich publizierte Fall einer HCV-Transmission durch fehlerhafte NAT-HCV Ablesung bei einem Organ- und Gewebespende verdeutlicht [14]. Bescheiden müssen wir einräumen: „Sicher ist, dass nichts sicher ist. Selbst das nicht“ [Joachim Ringelnitz]. Aber eine größtmögliche Sicherheit bei der Verwendung von Materialien humanen Ursprungs wird durch ein mehrstufiges Konzept erreicht, welches im Wesentlichen auf die sorgfältige Selektion der Spender mit Blick auf ein geringes Infektionsrisiko, der möglichst sensitiven und spezifischen Testung auf relevante Erreger und die Einführung von Produktionsschritten, die Erreger inaktivieren oder entfernen können.

5. Zusammenfassung

Geschädigte Organe und Gewebeverbände können sich nicht ad integrum regenerieren und gegebenenfalls kommt therapeutisch nur ein Ersatz betroffener Teile in Frage. Das Tissue Engineering gelingt bis heute nur in geringem Maß und erreicht den Level einfach aufgebauter Knorpelgewebe oder Hautzellverbände, nicht aber komplexer Gewebestrukturen oder Organe. Daher sind die Organ und Gewebeübertragungen von Lebend- oder Leichenspendern von großer Bedeutung in der modernen Medizin. In Deutschland werden derzeit etwa 50.000 postmortale Transplantate verwendet und der Bedarf ist steigend. Das Hauptrisiko hierbei besteht in der potenziellen Übertragung klinisch relevanter Infektionserreger.

Zur weiteren Minimierung dieses Restrisikos hat sich im Tissue Banking ein aus der Transfusionsmedizin abgeleitetes Sicherheitsstufenkonzept etabliert und umfasst gesetzlich vorgeschriebene Qualitätskriterien für Spenderauswahl, Labortestung, Gewebegewinnung und -verarbeitung, mikrobiologischen Inaktivierungsverfahren und Qualitätssicherung. Dieses Konzept kann nicht unverändert von Lebend- auf Leichenspender übertragen werden, da die relevanten Untersuchungen bei Lebendspendern ausschließlich aus frischen Blutproben durchgeführt werden. Dementsprechend sind die im Blutspendewesen verwendeten infektionsserologischen bzw. Nukleinsäure-Amplifikations-Technik (NAT)-Teste nur für prämortale aber nicht für postmortale Proben validiert und lizenziert. Bei Leichenspendern muss jedoch häufig postmortales Blut getestet werden, insbesondere dann, wenn es sich nicht um Multiorganspender handelt (z.B. Spender aus Rechtsmedizinischen Instituten) oder wenn keine frischen (<7 Tage) prämortalen Blutproben verfügbar sind.

Die Ergebnisse vereinzelter Studien in diesem Zusammenhang sind widersprüchlich und erlauben keine Schlussfolgerungen.

Insofern sind die Themen der Vergleichbarkeit prä- und postmortaler Probenentstehung, der Entwicklung von Algorithmen zur Validierung aus postmortalem Blut und Untersuchungen zur Stabilität von Antigenen und Antikörpern für HIV, HBV und HCV in Leichenblut von hohem wissenschaftlichem und klinischem Interesse.

Die Schwerpunkte dieser Arbeit umfassen folgende Fragestellungen:

Gibt es Unterschiede zwischen der prä- und postmortalen Infektionstestung aus Blutproben desselben Gewebespenders?

Wie kann eine Validierung von infektionsserologischen Testsystemen für postmortale Blutproben durchgeführt werden? und

Ist der sichere Nachweis von Anti-HIV 1/2, HBsAg, Anti-HBc und/oder Anti-HCV aus Blutproben von potenziell infektiösen Spendern bis zu 48 Stunden postmortal möglich?

Im ersten Teilprojekt der hier vorgelegten Arbeit wurde bei 487 Hornhautspendern eine Übereinstimmung der infektionsserologischen Testergebnisse auf Anti-HIV 1/2, HBsAg, Anti-HBc und Anti-HCV zwischen prä- und postmortalen Proben in 95,7% ermittelt. Es kam insgesamt bei 21 Fällen zu Diskrepanzen (4,3%). Bei 17 (3,5%) postmortalen Proben waren die Ergebnisse falsch positiv und bei 4 (0,8%) falsch negativ.

Im zweiten Teilprojekt wurde eine prospektive Untersuchung des Verlaufs serologischer Parameter für HIV-, HBV- und HCV-Infektionen bei 30 kühl gelagerten Verstorbenen mit diesen Infektionskrankheiten bis zu 48 Stunden postmortem (0, 12, 24, 36, 48 Std.) vorgenommen. Mit dieser erstmals durchgeführten Studie konnte bei allen untersuchten Parametern eine Antigen- bzw. Antikörperstabilität bis zu 48 Stunden postmortem nachgewiesen werden.

Im dritten Teilprojekt wurden 20 postmortale Blutproben von Augenhornhautspendern in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (low/high) mit definierten PEI/WHO-Standards für Anti-HIV 1/2, HBsAg, Anti-HBc und Anti-HCV gespiket und unter Mitführung einer Negativkontrolle am BEP-III-Laborautomaten (Siemens) untersucht. Im Ergebnis wurden alle ungespiketen Proben richtig negativ und alle gespiketen Proben richtig positiv bestimmt. Bei der unter vergleichbarer Logistik durchgeführten Untersuchung auf *Treponema pallidum* wurden in zwei Fällen falsch positive Ergebnisse ermittelt. Beide Proben waren makroskopisch auffällig und stark hämolytisch. Schließlich wurde auch der Genomnachweis für HIV, HBV, HCV und HAV unter Verwendung von PEI-Standards validiert. Es konnten für sämtliche untersuchten Viren in allen Proben richtige Ergebnisse ermittelt werden. Ein Einfluss der p.m. Entnahmezeit oder einer Hämolyse auf die Messergebnisse zeigte sich nicht.

Mit den vorgestellten Studien konnten wir aufzeigen, dass Infektionen mit HIV, HBV, HCV und *Treponema pallidum* aus p.m. Blut bis zu zwei Tagen postmortem valide detektiert werden. Dabei können falsch positive und falsch negative Ergebnisse durch optimierte präanalytische Vorgehensweisen weitgehend verhindert werden.

6. Literatur

1. Alborino F, Burighel A, Tiller FW, van Helden J, Gabriel C, Raineri A, Catapano R, Stekel H. Multicenter evaluation of a fully automated third-generation anti-HCV antibody screening test with excellent sensitivity and specificity. *Med Microbiol Immunol* 2011; 200: 77-83.
2. Bankowski MJ, Landay AL, Staes B, Shuburg R, Kritzler M, Hajakian V, Kessler H. Postmortem recovery of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from plasma and mononuclear cells: Implications for occupational exposure. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 1124-7.
3. Behets F, Bertozzi S, Kasali M, Kashamuka M, Atikala L, Brown C, Ryder RW, Quinn TC. Successful use of pooled sera to determine HIV-1 seroprevalence in Zaire with development of cost-efficiency models. *AIDS* 1990; 4(8): 737-41.
4. Belcher L, Chandler L, Kasprisin D, Gilcher RO. A Case Study: HIV Positive Donor with Negative PCR. 27th Annual Meeting of American Association of Tissue Banks, San Diego, California, USA, August 23-26, 2003: S-5.
5. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6:468-75.
6. Brown P, Preece M, Brandel JP, Sato T, McShane L, Zerr I, Fletcher A, Will RG, Pocchiari M, Cashman NR, d'Aignaux JH, Cervenáková L, Fradkin J, Schonberger LB, Collins SJ. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* 2000; 55: 1075-81.
7. Bundesärztekammer - Wissenschaftlicher Beirat, Paul-Ehrlich-Institut. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Deutscher Ärzte-Verlag 2010.
8. Bundesgesetzblatt. Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen und Geweben (Transplantationsgesetz - TPG). Fassung vom 19.Oktober 2012; BGBl. I 2012: 192
9. Bundesgesetzblatt. Verordnung über die Anforderungen an Qualität und Sicherheit der Entnahme von Geweben und deren Übertragung nach dem Transplantationsgesetz (TPG-Gewebeverordnung - TPG-GewV). Fassung vom 26.März 2008; BGBl. I 1998: 512
10. Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Stramer SL, Hewlett I, Preston S. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion* 2000; 40:143-59.

11. Burtonboy G, Delloye C. Polymerase chain reaction in cadaveric blood and tissues. *Transplant Proc* 1996; 28(5): 2927-8.
12. Center for Disease Control and Prevention. Human immunodeficiency virus infection transmitted from an organ donor screened for HIV antibody - North Carolina. *MMWR* 1987; 36: 306-8
13. Center for Disease Control and Prevention. Hepatitis C Virus Transmission From an Antibody-Negative Organ and Tissue Donor - United States, 2000 to 2002. *MMWR* 2003; 52(13): 273.
14. Center for Disease Control and Prevention. Transmission of Hepatitis C Virus Through Transplanted Organs and Tissue - Kentucky and Massachusetts. *MMWR* 2011; 60(50): 1-4.
15. Center for Disease Control and Prevention. Update: allograft-associated bacterial infections. *MMWR* 2002; 51(10): 207-10
16. Challine D, Roudot-Thoraval F, Sabatier P, Dubernet F, Larderie P, Rigot P, Pawlotsky JM. Serological viral testing of cadaveric cornea donors. *Transplantation* 2006; 82(6): 788-93.
17. Challine D, Pellegrin B, Bouvier-Alias M, Rigot P, Laperche L, Pawlotsky JM. HIV and hepatitis C virus RNA in seronegative organ and tissue donors. *Lancet* 2004; 364: 1611-2.
18. Chudy M, Weber-Schehl M, Pichl L, Jork C, Kress J, Heiden M, Funk MB, Nübling CM. Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus Type 1 may require two different amplification targets. *Transfusion* 2012; 52: 431-9
19. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat* 2001; 8: 87-95.
20. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77(2): 214-24.
21. Constantine NT. Serologic tests for the retroviruses: approaching a decade of evolution. *AIDS* 1993; 7: 1-13.
22. Douceron H, Deforges L, Gherardi R, Sobel A, Chariot P. Long-lasting postmortem viability of human immunodeficiency virus: A potential risk in forensic medicine practice. *Forensic Science International* 1993; 60: 61-6.
23. Dow, BC. Microbiology confirmatory tests for blood donors. *Blood Reviews* 1999; 13: 91-104.

24. Dow, BC. Noise in microbiological screening assays. *Transfusion Medicine* 2000; 10: 97-106.
25. Eastlund T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant* 1995; 4(5): 455-77.
26. Eastlund T. Hemodilution due to blood loss and transfusion and reliability of cadaver tissue donor infectious disease testing. *Cell and Tissue Banking* 2000; 1: 121-7.
27. European Union: Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*, 7.4.2004;102: 48-58.
28. European Union: Commission Directive 2006/17/EC of 8 February 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*, 9.2.2006; 38: 40-52.
29. European Union: Commission Directive 2006/86/EC of 24 October 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards traceability requirements, notification of serious adverse reactions and events and certain technical requirements for the coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*, 25.10.2006; 294: 32-50.
30. European Directorate for the quality of medicines (EDQM), European Pharmacopoeia Commission (2006) Monograph Nr. 853, PA/PH/Exp. 6B/T (05); 44 01/2008: 0853
31. Fordyce JA. Some problems in the pathology of syphilis. *American Journal of the Medical Sciences* 1915; 149: 781-808
32. Funk MB, Günay S. Haemovigilance Report of the Paul-Ehrlich-Institut 2010: Assessment of the Reports of Serious Adverse Transfusion Reactions pursuant to Section 63 c AMG (Arzneimittelgesetz, German Medicinal Products Act) 2012; 17-8
33. Galea G, Dow BC. Comparison of prevalence rates of microbiological markers between bone/tissue donations and new blood donors in Scotland. *Vox Sang* 2006; 91: 28-33.
34. Glasser DB. Serologic testing of cornea donors. *Cornea* 1998; 17:123-8.
35. Glynn SA, Kleinman SH, Wright DJ, Busch MP. International application of the incidence rate/window period model. *Transfusion* 2002; 42: 966-72
36. Hatzakis A, Wait S, Bruix J, Buti M, Carballo M, Cavaleri M, Colombo M, Delarocque-Astagneau E, Dusheiko G, Esmat G, Esteban R, Goldberg D, Gore C, Lok AS, Manns M, Marcellin P, Papatheodoridis G, Peterle A, Prati D, Piorkowsky N, Rizzetto M, Roudot-Thoraval F, Soriano V, Thomas HC, Thursz M, Valla D, van Damme P,

- Veldhuijzen IK, Wedemeyer H, Wiessing L, Zanetti AR, Janssen HL. The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference. *J Viral Hepatitis* 2011; 18 (Suppl. 1): 1-16
37. Heim A, Wagner D, Rothämel T, Hartmann U, Flik J, Verhagen W. Evaluation of serological screening of cadaveric sera for donor selection for cornea transplantation. *J Med Virol* 1999; 58: 291-5.
 38. Hinsenkamp L, Muylle T, Eastlund D, Fehily L, Noël D, M Strong. Adverse reactions and events related to musculoskeletal allografts: reviewed by the World Health Organisation Project NOTIFY. *International Orthopaedics* 2012; 36: 633-41.
 39. Hoft RH, Pflugfelder SC, Forster RK, Ullman S, Polack FM, Schiff ER. Clinical evidence for hepatitis B transmission resulting from corneal transplantation. *Cornea* 1997; 16: 132-7.
 40. Kainer MA, Linden JV, Whaley DN et al. Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts. *N Engl J Med* 2004; 350: 2564-71
 41. Karhunen PJ, Brummer-Korvenkontio H, Leinikki P, Nyberg M. Stability of human immunodeficiency virus (HIV) antibodies in postmortem samples. *J Forensic Sci.* 1994; 39:129-35.
 42. Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden TM. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2012; 55 Suppl 1: 43-8.
 43. Laycock KA, Essary LR, Delaney S, Kuhns MC, Pepose JS. A critical evaluation of hepatitis C testing of cadaveric corneal donors. *Cornea* 1997; 16: 146-50.
 44. Lee HM, Naor J, Alhindi R, Chinfook T, Kraiden M, Mazzulli T, Rootman DS. Detection of hepatitis C virus in the corneas of seropositive donors. *Cornea* 2001; 20: 37-40.
 45. LeFor WM, Shires DL Jr, McGonigle AF, Shires DL. Hemoconcentration prior to serology testing in hemodiluted cadaver bone and tissue donors. *Clin Transplant* 1995; 9: 297-300.
 46. Lefrère JJ, Sellami F, Larderie P, Lemaillet C, Roudot-Thoraval F, Claquin J. Six years experience testing organ donors for viral markers in France. *Transfusion* 1997; 37: 565-6.
 47. Linauts S, Saldanha J, Strong DM. PRISM hepatitis B surface antigen detection of hepatitis B virus minipool nucleic acid testing yield samples. *Transfusion* 2008; 48: 1376-82.
 48. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004; 363: 417-21.

49. Lord CF, Gebhardt MC, Tomford WW, Mankin HJ. Infection in bone allograft. Incidence, nature, and treatment. *J Bone Joint Surg* 1988; 70: 369-76
50. Lou SC, Pearce SK, Lukaszewska TX, Taylor RE, Williams GT, Leary TP. An improved Abbott ARCHITECT assay for the detection of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). *J Clin Virol* 2011; 51: 59-63.
51. Mendez R, Aswad S, Bogaard T, Khetan U, Asal R, Martinez A, Flores N, Mendez RG. Donor hepatitis C antibody virus testing in renal transplantation. *Transplant Proc* 1993; 25: 1487-90.
52. Miédougé M, Chatelut M, Mansuy JM, Rostaing L, Malecaze F, Sandres-Sauné K, Boudet F, Puel J, Abbal M, Izopet J. Screening of blood from potential organ and cornea donors for viruses. *J Med Virol* 2002; 66: 571-5.
53. Morris A, Strickett MG, Barratt-Boyes BG. Use of aortic valve allografts from hepatitis B surface antigen-positive donors. *Ann Thorac Surg* 1990; 49: 802-5.
54. Neill AG, Conradie JD. Low cost anti-HCV screening of blood donors. *Lancet* 1992; 340: 1096.
55. Niederhauser C, Ströhle A, Stolz M, Müller F, Tinguely CJ. The risk of a second diagnostic window with 4th generation HIV assays: Two cases. *Clin Virol* 2009;45: 367-9.
56. Novick SL, Schragar JA, Nelson JA, Anderson ME, Baskin BL. Comparison of two hepatitis B surface antigen and two HIV-1 (p24) antigen enzyme immunoassay kits using hemolyzed cadaveric blood specimens. *Transplant Proc* 1996; 28: 2925-6.
57. Offergeld R, Ritter S, Hamouda O. HIV-, HCV-, HBV- und Syphilissurveillance unter Blutspendern in Deutschland 2008-2010. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2012; 55: 907-13
58. Orlando G, Wood KJ, Stratta RJ, Yoo JJ, Atala A, Soker S. Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future. *Transplantation* 2011; 91: 1310-7.
59. Padley D, Ferguson M, Warwick RM, Womack C, Lucas SB, Saldanha J. Challenges in the testing of non-heart-beating cadavers for viral markers: implications for the safety of tissue donors. *Cell Tissue Bank* 2005; 6: 171-9.
60. Padley DJ, Lucas SB, Saldanha J. Elimination of false-negative hepatitis C virus RNA results by removal of inhibitors in cadaver-organ donor blood specimens. *Transplantation* 2003; 76: 432-4.
61. Paul Ehrlich Institut (PEI) Bekanntmachung über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Verminderung des Risikos von Hepatitis B -, Hepatitis C- und HIV-Infektionen bei Empfängern von Erythrozytenkonzentraten. *Bundesanzeiger* 1998; 53: 3835

62. Paul Ehrlich Institut (PEI) Verminderung des Risikos von HIV -1 - Infektionen durch zelluläre Blutprodukte und gefrorenes Frischplasma Anordnung der Testung auf HIV -1'-RNA mit Nukleinsäure-Amplifikationstechniken. Bundesanzeiger 2003; 103: 12269
63. Pepose J.S., Buerger, D.G., Paul, D.A., Quinn, T.C., Darragh, T, M. & Donegan, E. New Developments in Serologic Screening of Donors for Corneal HIV-1 and Hepatitis B Virus. *Infections Ophthalmology* 1992; 99: 879-88
64. Pepose JS, Pardo F, Kessler JA 2nd, Kline R, Donegan E, Quinn TC. Screening cornea donors for antibodies against human immunodeficiency virus. Efficacy of ELISA testing of cadaveric sera and aqueous humor. *Ophthalmology* 1987; 94: 95-100.
65. Pereira BJ, Levey AS. Hepatitis C infection in cadaver organ donors: strategies to reduce transmission of infection and prevent organ waste. *Pediatr Nephrol* 1995; 9 Suppl: 23-8.
66. Pereira BJ, Wright TL, Schmid CH, Bryan CF, Cheung RC, Cooper ES, Hsu H, Heyn-Lamb R, Light JA, Norman DJ, et al. Screening and confirmatory testing of cadaver organ donors for hepatitis C virus infection: A U.S. National Collaborative Study. *Kidney Int* 1994; 46: 886-92.
67. Pereira BJ, Milford EL, Kirkman RL, Levey AS, Tomford WW, Leibowitz H, Rhodes M, Quan S, Wilbur JC. Low risk of liver disease after tissue transplantation from donors with HCV. *Lancet* 1993; 341: 903-4.
68. Pruß A, Meyer R, Knobl HJ, Morschheuser T, Börgel M, Wittmann G, Bogers A, van den Bogaerdt A, Bokhorst A, Gummert J. Analyse der Tätigkeiten kardiovaskulärer Gewebebanken in Deutschland in den Jahren 2007 bis 2010. *Zeitschrift für Herz-,Thorax- und Gefäßchirurgie* 2012; 26: 214-21.
69. Pruss A, Caspari G, Krüger DH, Blümel J, Nübling CM, Gürtler L, Gerlich WH. Tissue donation and virus safety: more nucleic acid amplification testing is needed. *Transpl Infect Dis* 2010; 12: 375-86.
70. Robert Koch Institut (RKI) Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland Virushepatitis B, C und D im Jahr 2011. *Epidemiol Bull* 2012; 38: 372-88
71. Robert Koch Institut (RKI) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2011. Berlin, 2012: 172-77 (http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2011.pdf).
72. Robert PY, Adenis JP, Pleyer U. How 'safe' is corneal transplantation? A contribution on the risk of HSV-transmission due to corneal transplantation. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2005; 222: 870-3.
73. Satterthwaite R, Ozgu I, Shidban H, Aswad S, Sunga V, Zapanta R Jr, Asai P, Bogaard T, Khetan U, Mendez RG, Mendez R. Risks of transplanting kidneys from hepatitis B surface antigen-negative, hepatitis B core antibody-positive donors. *Transplantation* 1997; 64: 432-5.

74. Scheiblauer H, El-Nageh M, Nick S, Fields H, Prince A, Diaz S. Evaluation of the performance of 44 assays used in countries with limited resources for the detection of antibodies to hepatitis C virus. *Transfusion* 2006; 46: 708-18.
75. Scheiblauer H, Soboll H, Nick S. Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. *J Med Virol* 2006; 78 Suppl 1: 66-70.
76. Schwarz, A, Hoffman F, L'age-Stehr J, Tegzess AM, Offermann G. Human immunodeficiency virus transmission by organ donation: Outcome in cornea and kidney recipients. *Transplantation* 1987; 44: 21-4
77. Sengler V, Reinhard T, Adams O, Gerlich W, Sundmacher R. Testing of corneal scleral discs and their culture media of seropositive donors for hepatitis B and C virus genomes. *Graefes Arch Clin Exper Ophthalmol* 2001; 239: 783-7.
78. Shutkin NM . Homologous-serum hepatitis following the use of refrigerated bone-bank bone. *J Bone Joint Surg Am* 1954; 36-A: 160-2
79. Stanworth SJ, Warwick RM, Ferguson M, Barbara JA. A UK survey of virological testing of cadaver tissue donors. Microbiology Working Group of the NIBSC steering group on Tissue/Cell Banking and Engineering. *Vox Sang* 2000; 79: 227-30.
80. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, Dodd RY, Busch MP; National Heart, Lung, and Blood Institute Nucleic Acid Test Study Group. Detection of HIV-1 and HCV Infections among Antibody-Negative Blood Donors by Nucleic Acid–Amplification Testing. *N Engl J Med*. 2004; 351: 760-8
81. Tariciotti L, Das I, Dori L, Perera MT, Bramhall SR. Asymptomatic transmission of *Treponema pallidum* (syphilis) through deceased donor liver transplantation. *Transpl Infect Dis* 2012; 14: 321-5.
82. Thuret G, Acquart S, Gain P, Thuret G, Dumollard JM, Manissolle C, Campos-Guyotat L, Gain P, Labetoulle M, Bourlet T. Ultrastructural demonstration of replicative herpes simplex virus type 1 transmission through corneal graft. *Transplantation* 2004; 77: 325-6.
83. Tugwell BD, Patel PR, Williams IT, Hedberg K, Chai F, Nainan OV, Thomas AR, Woll JE, Bell BP, Cieslak PR. Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor. *Ann Intern Med* 2005; 143: 648-54
84. UNAIDS (2011) World AIDS Day Report
85. Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, Vermeylen C. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang*. 1994; 66: 122-9.
86. Veropalumbo E, Marrone A, Vallefucio L, Perruolo G, Orlando R, Scordino F, Tosone G, Zampino R, Trani B, Genovese A, Spadaro G, D'Orio C, Portella G.

Immunocompromised Patients with HBsAg a Determinant Mutants: Comparison of HBsAg Diagnostic Assays. *Intervirology* 2010; 53: 183-7

87. Yerly S, Pedrocchi M, Perrin L. The use of polymerase chain reaction in plasma pools for the concomitant detection of hepatitis C virus and HIV type 1 RNA. *Transfusion* 1998; 38: 908-14
88. Watkins BP, Haushalter RE, Bolender DL, Kaplan S, Kolesari GL. Postmortem blood tests for HIV, HBV, and HCV in a body donation program. *Clin Anat* 1998; 11: 250-2.
89. Weber B, Dengler T, Berger A, Doerr HW, Rabenau H. Evaluation of two new automated assays for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) detection: IMMULITE HBsAg and IMMULITE 2000 HBsAg. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 135-43.
90. Wendel S. Current concepts on transmission of bacteria and parasites by blood components. *Vox Sang* 1994; 67 [Suppl 3]: 161-74
91. Zou S, Dodd RY, Stramer SL, Strong DM. Probability of viremia with HBV, HCV, HIV, and HTLV among tissue donors in the United States. *N Engl J Med* 2004; 351: 751-9.

7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Axel Pruß für die große fachliche und menschliche Unterstützung bei der Durchführung der Projekte herzlich. Ohne dessen Weitblick gepaart mit fachlicher und sozialer Kompetenz, großem Engagement und Zielstrebigkeit wäre die Durchführung der Validierungsstudien nicht möglich gewesen wäre.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. Abdulgabar Salama, der mich mit seiner Wertschätzung und seinem geschenkten Vertrauen zur Habilitation ermutigte und mich bei deren Verwirklichung mit seiner Fähigkeit zur Extraktion auf Wesentliches unterstützte.

Ich danke Frau Dipl.-Biol. Ina Wilkemeyer und Herrn Dr. Jan Schroeter für die fruchtbare Zusammenarbeit und die Bereitstellung der p.m. Blutproben.

Ich danke Herrn PD Dr. Gregor Caspari für die intensive Zusammenarbeit, für das gemeinsame Finden von Ideen, Konzepten, Problemlösungen bis hin zum gemeinsamen Finden einer Formulierung. Und für die Ausstrahlung, dass gemeinsames Forschen auch Spaß machen darf.

Meiner Lebenspartnerin Frau Dr. Monika Girisch, die mir den Rücken von allen Störgrößen freigehalten hat, damit ich mich auf die Arbeit konzentrieren konnte und trotzdem die Balance zwischen Zielstrebigkeit und notwendiger Entspannung für uns gefunden hat.

Meinen Eltern, im Besonderen meinem Vater, der mich immer zu einer Habilitation ermutigt hat.

Abschließend möchte ich allen Mitarbeitern der Gewebebank und des infektionsserologischen Labors der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Transfusionsmedizin, meinen ganz persönlichen und besonderen Dank aussprechen, ohne deren Hilfe und unermüdlige Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Einschließen möchte ich diejenigen ärztlichen Kollegen, die mir die notwendigen Freiräume im Alltag geschenkt haben, die notwendig sind, um solch ein Projekt durchzuführen.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed
Habitationsordnung der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin

Hiermit erkläre ich, dass

1. weder früher noch gleichzeitig ein Habitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
2. die vorgelegte Habitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habitationsschrift angegeben wurden,
3. mir die geltende Habitationsordnung bekannt ist.

.....
Ort, Datum ..

.....
Unterschrift