

T. von Garrel · Klinik für Unfallchirurgie der Philipps-Universität Marburg · H. Knaepler · Unfallchirurgische Klinik Wetzlar · L. Gürtler · Max v. Pettenkofer Institut der LMU München

Untersuchungen zur Inaktivierung von HIV-1 in humanen Femurköpfen durch Verwendung eines thermischen Desinfektionssystems (Lobator SD-1)

Zusammenfassung

In der modernen Unfallchirurgie und Orthopädie wird die Anwendung allogener Knochentransplantate durch das mögliche Übertragungsrisiko von Infektionserkrankungen erheblich eingeschränkt. Eine Lösungsmöglichkeit bietet die Anwendung eines thermischen Desinfektionssystems (Lobator SD-1), welches mit einer Inaktivierungstemperatur von 80 °C arbeitet und in der Lage ist, zahlreiche bakterielle und virale Infektionserreger abzutöten. In dieser Studie wurde die Inaktivierungskinetik von HIV durch Wärmebehandlung im Lobator SD-1 untersucht. Dabei wurden humane Femurköpfe mit 100 µl einer hochangereicherten Suspension von freiem und zellgebundenem HIV (10¹⁰) beladen und dem Desinfektionsprozeß für 5, 10, 20, 30, 40, 50 bzw. 62 min ausgesetzt. Die anschließende Reaktivierung erfolgte mit Hilfe von HUT-78 Zellen durch Titration der Virussuspension in 10facher Verdünnung über 10 Verdünnungsstufen und Inkubation bis maximal 21 Tage. Der Virusnachweis wurde durch Beobachtung von Riesenzellformationen und quantitativem p24-Antigenachweis im ELISA-Test durchgeführt. Dabei konnte eine lineare Virusinaktivierung in Abhängigkeit von der Erwärmungszeit gefunden werden. Ab einer 40minütigen Behandlung im Desinfektionssystem (Normalprozeßzeit 92 min, Zieltemperatur 80 °C) war eine vollständige Virusinaktivierung zu verzeichnen. Die Ergebnisse zeigen, daß durch eine Behandlung humaner Femurköpfe im thermischen Desinfektionssystem eine sichere Inaktivierung von HIV erreicht wird.

Schlüsselwörter

Allogene Knochen transplantation · HIV · Thermische Desinfektion · HIV-Inaktivierung

Die Transplantation von kryokonservierten, allogenen Knochen zur Auffüllung ossärer Defekte hat mit Einführung der Knochenbanktechnik in der modernen Unfallchirurgie und Orthopädie einen festen Stellenwert [16, 25, 29, 41]. Derzeit werden in Deutschland jährlich ca. 20 000 und in den USA ca. 200 000 allogene Transplantate verwendet, wobei der eigentliche Bedarf sicher höher angesetzt wird [21, 41]. Die generelle Anwendbarkeit wird durch das Risiko der Übertragung bakterieller oder viraler Infektionen eingeschränkt [5, 23, 44]. Seit Bekanntwerden der ersten HIV-Übertragung durch ein allogenes Knochentransplantat in den USA und später in Europa und Deutschland ist die Deckung des Bedarfs an allogenen Transplantaten schwieriger geworden [3, 37]. Zahlreiche klinikinterne Knochenbanken mußten aufgrund der gestiegenen Sicherheitsansprüche aufgegeben werden [25]. Geeignete Sterilisations- oder Desinfektionsverfahren können die Transplantatsicherheit wesentlich erhöhen [15, 24, 26, 27].

Aus der Literatur ist die Thermolabilität von HIV und seiner Untergruppen bekannt [6, 11, 18, 19, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 46, 47]. Das seit 1992 in der klinischen Anwendung stehende Spongiosadesinfektionssystem Lobator SD-1 (Fa. Telos, Hungen) arbeitet mit einer Desinfektionstemperatur von 80 °C [26]. Da umfangreiche thermophysikalische Messungen in spongiosen Hüftköpfen nachweisen konnten, daß an jeder Stelle des dekortizierten Hüftkopfes für mindestens 10 min 80 °C erreicht werden, war davon auszugehen, daß HIV auch in hoher Konzentration nach dem Desinfektionsvorgang inaktiviert wird [24, 26].

Zielsetzung der Studie

Durch Inokulation humaner Femurköpfe mit hochkonzentrierter HIV-Suspension sollte die Inaktivierungskinetik der Infektiösität bei ansteigenden Temperaturen ermittelt werden. Ziel der Untersuchung war es, zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß die Infektiösität von HIV durch einen Erwärmungsprozeß bis zu einer Endtemperatur von 80 °C reduziert wird. Dadurch kann eine Aussage über das Restrisiko einer HIV-Übertragung durch ein allogenes Femurkopftransplantat nach einer thermischen Behandlung mit dem Marburger Knochenbanksystem getroffen werden.

Material und Methode

Bei der Planung und Durchführung der Experimente wurden die GLP-Richtlinien (good laboratory practice) eingehalten.

Probenmaterial

Als Prüfkörper wurden acht humane Femurköpfe verwendet, welche von nicht HIV-infizierten Patienten stammten, die nach endoprothetischer Hüftoperation entnommen wurden. Unmittelbar nach Entnahme wurden die Hüftköpfe von anhängendem Weichteilgewebe befreit und der Gelenkknorpelüberzug mit Hilfe einer sphärischen Fräse entfernt. Der Durchmesser der so bearbeiteten Femurköpfe lag zwischen 40 und 55 mm. Die Lagerung erfolgte im Tiefkühlfroster bei -20 °C. Bis zur Verwendung im Experiment wurden die Knochen keinem Erwärmungsprozeß ausgesetzt. Durch eine Bohrung von der Resektionsfläche des Knochens in das Kopfzentrum

Dr. T. von Garrel
Klinik für Unfallchirurgie, Philipps-Universität
Marburg, Baldingerstraße, D-35043 Marburg

T. von Garrel · H. Knaepler · L. Gürtler

Evaluation of the inactivation of HIV-1 in human femoral heads by heat treatment to 80 °C (Lobator SD-1)

Summary

The use of allogenic bone transplants in surgery has been greatly diminished owing to the risk of transmitting infectious diseases. This risk can be reduced by the use of a thermal disinfection system (Lobator SD-1). This is achieved by increasing the temperature to 80 °C, inactivating a number of bacterial and viral agents. In this study the decay of HIV at high temperature in the Lobator SD-1 was researched. In the center of human femoral heads 100 µl of a highly concentrated suspension of free and cell-bound HIV (10^{10}) was exposed to the thermal process at intervals of 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 62 min. For the recultivation HUT-78 cells were used through titration of the virus suspension in ten-fold dilutions over ten dilution steps and incubation up to a maximum of 21 days. Evidence of the virus was checked through observing giant cell formations and quantitative determination of p24 antigen using an Elisa test. Linear virus inactivation was found based upon the time the virus was exposed to heat. After a treatment of 40 min in the disinfection system, total virus inactivation was achieved. The normal disinfection process time using Lobator SD-1 is 92 min. A temperature of 80 °C is reached after approximately 45 min. The results prove that this system totally inactivates HIV in human femoral heads.

Key words

Allogenic bone transplantation · HIV · Thermal disinfection · HIV inactivation

Originalien

wurden die Femurköpfe zur Aufnahme eines 100 µl fassenden, 20 mm langen und 6 mm breiten Probenbehälters vorbereitet. Hierzu wurden verschließbare 100 µl PCR-Röhrchen (polymerase chain reaction) (Nunc, Wiesbaden) verwendet. Diese sind aus einem dünnwandigen Kunststoff hergestellt, um bei der PCR-Testung einen raschen Energietransfer zu gewährleisten. Außerdem ist ein sicherer Verschuß der Behältnisse in einem Temperaturbereich zwischen 4° und 95 °C gewährleistet. Für jedes Experiment ($n = 8$) wurde ein frischer Femurkopf verwendet. Nach Positionierung der Probenröhrchen im Hüftkopf, wurden die Bohrlöcher mit einem 1 mm dicken Kunststoffplättchen abgedichtet und der verbleibende Bohrkanaal mit einer mittelviskösen Silikonpaste (Baysilone Paste, Fa. Bayer, Leverkusen) aufgefüllt, um ein Eindringen von Flüssigkeit in den Bohrkanaal zu verhindern. Die Silikonsiegel hatten einen Durchmesser von 13 mm und eine Höhe zwischen 10 und 15 mm in Abhängigkeit vom Durchmesser des Femurkopfes.

Desinfektionssystem

Als Wärmequelle wurden vier Lobator SD-1 Geräte (Fa. Telos, Hungen) aus der laufenden Serienproduktion verwendet (Abb. 1). Ein temperatursensorgesteuertes, elektronisches Kontrollsystem gewährleistet dabei eine kontinuierliche Erwärmung eines Hüftkopfes auf 80 °C in flüssigem Medium (250 ml Ringer-Lösung) in einem Kunststoffbehälter innerhalb einer Erwärmungszeit von 62 min. Dabei ist das Erreichen der Zieltemperatur (80 °C) vom Durchmesser des Femurkopfes und seiner Knochendichte abhängig [26] (Abb. 2).

Die Hüftköpfe wurden nach Bestücken mit HIV-Suspension-gefüllten Probenröhrchen in die mit 250 ml Ringer-Lösung gefüllten Macrolon-Kunststoffbehälter gelegt und dem standardisierten Erwärmungsprozeß ausgesetzt. Die Abkühlung auf eine Temperatur zwischen 20° und 40 °C erfolgte auf der am Gerät angebrachten Kühlplatte unter permanentem Rühren der Ringer-Lösung mit einem geräteinternen Magnetrührer. Die Kontrolle der Temperatur erfolgte beim Aufheizprozeß über den geräteeigenen Temperaturanzeiger und bei

der Abkühlung durch einfache manuelle Kontrolle der Außenseite des Kunststoffbehälters.

Um die Kinetik der HIV-Inaktivierung zu analysieren, wurde der Erhitzungsprozeß an ausgewählten Zeitpunkten unterbrochen. In der 1. Versuchsreihe wurde der Erwärmungsprozeß nach 5, 20 und 40 min und in der 2. Serie nach 10, 30 und 50 min abgebrochen. Die Probe nach fünfminütiger Prozeßzeit wurde als Kontrollprobe im Knochen verwendet; unabhängig davon wurde eine Kontrollprobe durch HIV-Titration von der Ausgangssuspension durchgeführt.

Virus

Zur besseren Standardisierung wurde für diese Experimente das HIV-1 III B-Virus ausgewählt. Das HIV-1 III B-Virus, welches heute auch als LA 1-Virus bezeichnet wird, wurde dem Pettenkofer Institut 1984 durch R. Gallo, NIH, Bethesda, zur Verfügung gestellt. Das Virus wurde auf HUT-78-Zellen in RPMI-1680-Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum sowie Penicillin und Streptomycin als Antibiotikazusatz gezüchtet. Der Virustiter im Zellüberstand, der wöchentlich gewechselt wurde, betrug $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml. Die Zellkonzentration betrug 10^6 /ml.

Zur Herstellung der Virussuspension für die Inaktivierungsversuche wurde eine Zellsuspension von 10 ml für 7 min bei 1700 g zentrifugiert. Nach Entfernung von 9 ml des Überstands wurden die sedimentierten Zellen im verbleibenden Überstand suspendiert. Von dieser Suspension wurde je 100 µl in ein PCR-Probenröhrchen gefüllt und auf oben beschriebene Weise in den Hüftkopf eingebracht.

Titration

Um den Virusgehalt zu quantifizieren wurden 96-well-Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Wiesbaden) verwendet und die Virussuspension in 10facher Verdünnung titriert. Da nur 100 µl Probeninhalt verfügbar war, wurden je 10 µl der Probe in die 8 Vertiefungen der ersten Reihe der Mikrotiterplatte eingefüllt, welche jeweils 90 µl Medium enthielten. Nach Durchmischung mit der Mehrkanalpipette wurden wiederum je 10 µl aus der 1. Mikrotiterplattenreihe in die 2. übertragen. Endpunkt der Verdünnung waren für die ersten 30 min der

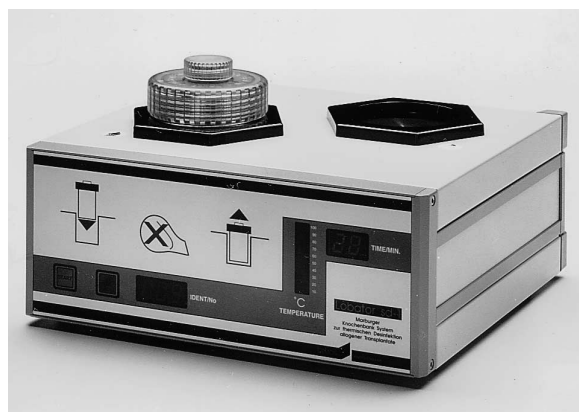


Abb. 1 ◀ Das Marburger Knochenbanksystem Lobator SD-1 (Fa. TELOS, Hungen) zur thermischen Desinfektion allogener Femurkopftransplantate

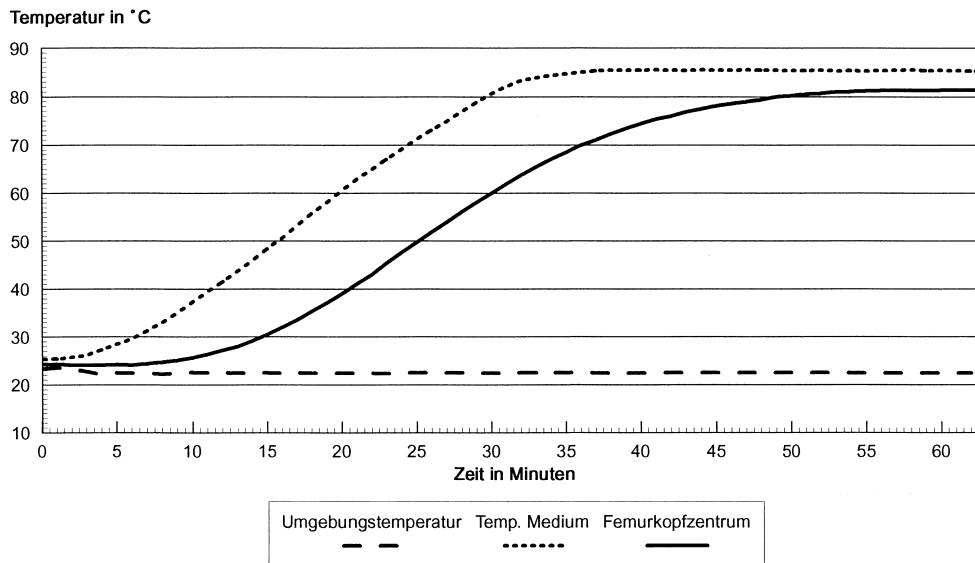


Abb. 2 ▲ Beispiel für den Temperaturverlauf bei der Erwärmung eines humanen, dekortizierten Hüftkopfes (Durchmesser 53 mm) im thermischen Desinfektionssystem Lobator SD-1. Angegeben ist die Umgebungstemperatur, die Temperatur im Erwärmungsmedium (250 ml Ringer-Lösung) sowie im Hüftkopfkopfzentrum

Wärmeinaktivierungsprozeß 10 bzw. 9 Verdünnungsstufen. Diese wurden reduziert für die Inaktivierungsversuche nach 40 und 62 min.

Nach Titration der Virussuspension wurden 50 µl HUT-78 Zellen in einer Konzentration von 10^6 /ml in jede Plattenvertiefung zugefügt. Jede Mikrotiterplatte wurde mit einem Kunststoffdeckel geschlossen und für 21 Tage in einer Atmosphäre von 6% CO₂ bei 36°C inkubiert. Jeweils 10 µl des Überstands wurden zur Bestimmung des p24-Antigens nach 1, 8, 16 und 21 Tagen in einer Verdünnung von 1:50 entnommen.

Die quantitative Bestimmung wurde nach der Methode von Kärber und Sperman durch Bestimmung des p24-Antigengehalts im Zellüberstand vorgenommen. Eine Extinktion von >1,5 wurde dabei als positiv angesehen.

Nachweis der Virusvermehrung

Zwei Methoden wurden angewendet, um die Virusvermehrung zu bestimmen: die Bildung von Riesenzellen und die Bestimmung des p24-Antigens im Zellüberstand mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Tests.

Zur Registrierung der Riesenzellen wurden die Mikrotiterplatten 2mal wöchentlich mit einem Inversionsmikroskop kontrolliert. Frisch gebildete Syncytien wurden dadurch einfach erkannt und im Zeitverlauf beobachtet. Da auch die inaktivierten Zellsuspensionen, die den PCR-Probenröhrchen zugefügt wurden, Riesenzellen enthielten, welche durch den Inaktivierungsprozeß nicht zerstört wurden, war das Ablesen der ersten 2. Reihen der Mikrotiterplatten unsicher.

Zur Bestimmung des p24-Antigens wurde der p24-Antigentest von Pasteur, Marne la Coquette, Frankreich, verwendet. Dieser wird auf Mikrotiterplatten ausgeführt. Die Test-

ausführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Um eine Mitbestimmung von viralem Antigen von bereits inaktivierten Viren zu verhindern, wurde eine 1:50 Verdünnung des Überstands verwendet. In jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde die Bestimmung des p24-Antigens einzeln vorgenommen. Ein Poolen fand nicht statt. Die ELISA-Extinktionsergebnisse wurden an einem Photometer bei 492 nm Wellenlänge vorgenommen. Nur bei einem Extinktionswert >1,5 wurde das Ergebnis als positiv gewertet.

Um eine mögliche HIV-Restaktivität in der 1. Reihe der Mikrotiterplatte bei der Inaktivierungsserie nach 40 und 62 min sicher auszuschließen, wurde der Inhalt der 1. Reihe, d. h. Zellen und Überstand, abgezogen und auf eine 48-well-Mikrotiterplatte mit jeweils 200 µl Medium und 10^5 HUT-78-Zellen übertragen. Hier wurde wiederum das Auftreten von Riesenzellen kontrolliert als auch das p24-Antigen bestimmt.

Ergebnisse

HIV-Kontrolltiter

Ein Aliquot der Ausgangs-HIV-Suspension für die zwei Versuchsserien ergab einen Virustiter von $10.12 \log_{10}$ bzw. $10.38 \log_{10}$. Wie in den Abb. 3 und 4 dargestellt, wurde der Maximalwert nach 16 Inkubationstagen erreicht. Ein weiterer Titeranstieg bis zum 21. Tag konnte nicht gemessen werden, so daß am 16. Tag der Endpunkt des Viruswachstums erreicht war.

Titerabfall durch Wärmeinaktivierung

Es wurden zwei Versuchsserien durchgeführt, um die Reduktion der Virusinfektiosität während des thermischen Behandlungsprozesses zu messen. Im 1. Experiment wurde der Erwärmungsprozeß nach 5, 10 und 40 min unterbrochen sowie ein vollständiger Erhitzungszyklus über 62 min durchgeführt. Um weitere Information über den Verlauf der Inaktivierungskinetik zu erhalten, wurde eine 2. Versuchsserie durchgeführt, wobei der Prozeßablauf nach 10, 30 und 50 min abgebrochen wurde. Die nach Durchführung der Erwärmungszyklen erreichten Virustiter nach 21 Tagen sind in den Abb. 3 und 4 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, daß nach einer Erhitzung von 30 min noch lebende Viren mit nachweisbarer Riesenzellbildung vorhanden waren. Nach einer Prozeßzeit von 40, 50 bzw. 62 min war kein Viruswachstum nachweisbar. Diese Kinetik der Virusinaktivierung ist in Abb. 5 dargestellt.

Die Ergebnisse beider Versuchsreihen zeigen, daß das HIV, im Zentrum humaner Femurköpfe, nach einer Prozeßzeit von 40 Minuten vollständig inaktiviert wurde. Die dabei erreichte Temperatur im Hüftkopfkopfzentrum lag über 65°C.

Subkultivierung von Zellen und Überstand nach 40- bzw. 62minütiger Wärmebehandlung

Um sicherzustellen, daß in der ersten Verdünnungsreihe der Titration der Virussuspension nach einer 40- bzw. 62minütigen Erwärmungszeit keine weitere Virusreplikation stattfand, wurde der In-

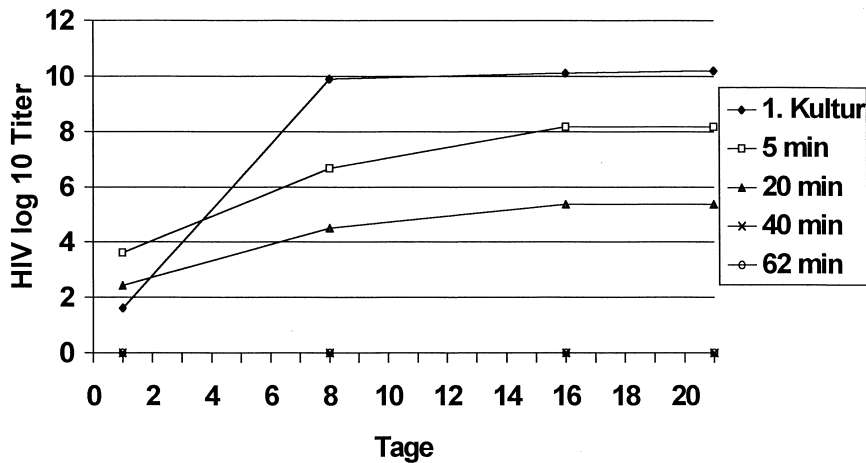


Abb. 3 ◀ Kinetik der HIV-Replikation: Titration der HIV-Suspension auf Mikrotiterplatten nach Behandlung im thermischen Desinfektionssystem Lobator SD-1 für 5, 20, 40 und 62 min. Die HIV-Suspension wurden in 10facher Verdünnung ausgebracht und zusammen mit 10^5 nicht infizierten HUT-78 Zellen inkubiert. Die Bestimmung der HIV-Aktivität erfolgte durch Beobachtung von Riesenzellbildung (hier nicht dargestellt) sowie Bestimmung des p24-Antigens im Zellüberstand. Die Berechnung des Titers erfolgte nach der Methode von Sperman und Kärber. Der maximale Titer wurde jeweils bereits nach 16 Tagen Inkubationszeit erreicht

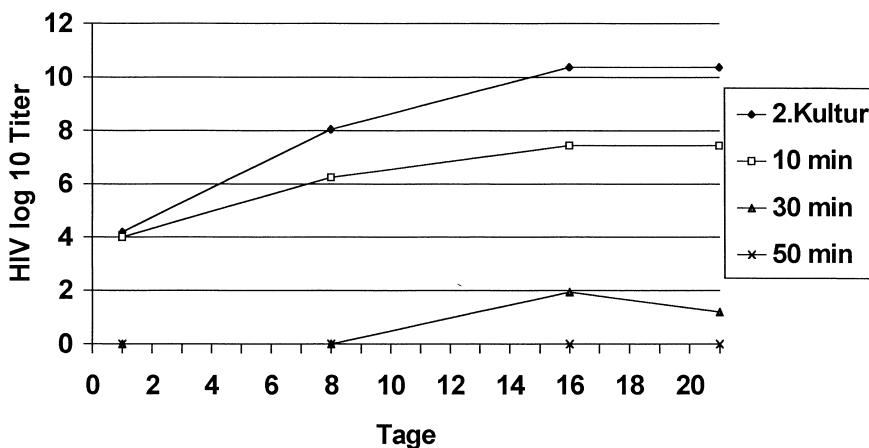


Abb. 4 ▲ Kinetik der HIV-Replikation durch Titration der HIV-Suspension nach Wärmeexposition in humanen Femurköpfen. Abbruch des Desinfektionsprozesses nach 10, 30 und 50 Minuten. Ein niedriger p24-Antigentiter konnte nach 30minütiger Wärmebehandlung beobachtet werden, während nach einer Prozeßzeit von 50 min keine Virusaktivität nachweisbar war

halt der Vertiefungen der Mikrotiterplatte (Zellen und Überstand) auf eine 48-well-Platte transferiert und zusammen mit 10^6 HUT-78-Zellen inkubiert. Auch nach 3wöchiger Inkubation konnte kein replikationsfähiges HIV nachgewiesen werden; der Nachweis von Riesenzellbildung war negativ und es gab keinen Anstieg von p24-Antigen im Zellüberstand.

Diskussion

Prinzipiell können mit der allogenen kryokonservierten Knochentransplantation verschiedene Krankheitserreger vom Spender auf den Empfänger übertragen werden [12, 13, 23]. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren zahlreiche nationale und internationale Empfehlungen und Richtlinien zum Führen einer Knochenbank publiziert, um das Risiko einer Infektionsübertragung durch

ein allogenes Transplantat zu reduzieren [1, 8, 9, 45]. Bei kritischer Würdigung der möglichen Untersuchungen des Spenders oder des Transplantats muß festgestellt werden, daß selbst bei aufwendigem Screening weder im bakteriellen noch im viralen Bereich eine 100% Sicherheit für Infektionsfreiheit des Transplantats erreicht werden kann [2].

Die oberflächliche Abstrichuntersuchung des Knochentransplantats auf Bakterien mit einem Watteträger ist unpräzise und kann nur auf der Oberfläche befindliche Kontaminationen erfassen [10]. Bei Untersuchung von Schnittpräparaten wurden bakterielle Kontaminationen von 15 bis über 60% nachgewiesen [5, 10, 41].

Auch der Nachweis viraler Erreger ist nicht in jedem Fall sicher. Zum einen ist eine breite Screeninguntersuchung aller in Frage kommenden Viren technisch

und aus Kostengründen nicht möglich, zum anderen besitzen einige Methoden durch den alleinigen Antikörpernachweis eine diagnostische Lücke [20, 34]. Dies betrifft insbesondere den Nachweis von Hepatitis-C-Virus und HIV.

Durch frühere Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß vegetative, bakterielle Erreger im Lobator SD-1 inaktiviert wurden [24, 26]. Die Thermolabilität der klinisch relevanten Keime bei 80°C war eine der Hauptgründe der Wahl dieser Desinfektionstemperatur [14, 31, 43].

Weitere Untersuchungen zur Inaktivierung umhüllter Viren konnten ebenfalls eine vollständige Inaktivierung von Zytomegalie-, Polio- und Gelbfieberviren nachweisen [42]. Nach 10minütiger Kerntemperaturerhitzung des Femurkopfes zeigte sich eine Reduktion der untersuchten Testviren von mindestens 5 Log-10-Stufen.

Problemviren sind Hepatitis B und C Viren [7, 22, 35, 36, 39]. Diese gelten als thermoresistent und insbesondere die Hepatitis-C-Viren als unsicher im Nachweis. In bisher unveröffentlichten Untersuchungen konnte auch eine Inaktivierung dieser Viren unter Versuchsbedingungen wie zur HIV-Inaktivierung verwendet nachgewiesen werden. Dabei wurden die Modellviren BVDV für die Hepatitis C und das Parvovirus für die Hepatitis B angewendet. Beide sind Referenzviren, da ein kultureller Virusnachweis für Hepatitis C und B in vitro nicht möglich ist. Obwohl die HIV-Übertragung unter Anwendung der serologischen Tests und einer korrekten Spenderanamnese lediglich mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 1:1 000 000 erfolgt, stellt sie zumindest forensisch und ethisch ein gravierendes Problem dar [2].

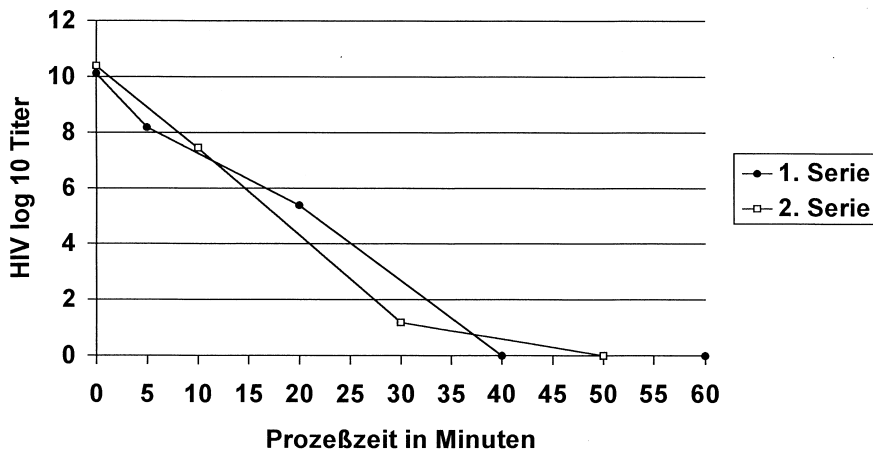


Abb. 5 ◀ **Kinetik der HIV-Inaktivierung: Abfall der HIV-Aktivität in Abhängigkeit von der Prozeßzeit im thermischen Desinfektionssystem Lobator SD-1.** Die ersten Werte bei 0 min entsprechen der HIV-Kontrolltitration. In der 1. Serie wurde der Erwärmungsprozeß nach 5, 20, 40 und 62 min unterbrochen, in der 2. Serie nach 10, 20 und 50 min. Nach einer Behandlungszeit von 40 min konnte keine HIV-Aktivität nachgewiesen werden

Auch die in letzter Zeit bekanntgewordenen Fälle HIV-infizierter Empfänger von allogenen Knochentransplantaten im Jahr 1985 in Deutschland haben zu einer erneuten Diskussion der Sicherheit geführt [25].

Die Ergebnisse der vollständigen Inaktivierung von HIV im Inneren des Hüftkopfes ist plausibel. Die Temperaturlabilität von HIV bei etwa 56 °C [38] bis 60 °C [47] wurden mehrfach publiziert (Tabelle 1). Die thermophysikalischen Prozesse der mindestens 10minütigen Erhitzung des Hüftkopfes im Originalverfahren des Lobator SD-1 sind bekannt [26]. Die Versuchsbedingungen sind für menschliche Knochentransplantate relevant:

- HIV lag bei diesen Versuchen sowohl in freier als auch in zellgebundener Form vor. Dies entspricht dem Vorkommen im menschlichen Körper.
- Die erreichten Titer waren höher als 10^8 . Diese Konzentration ist ca. 100fach höher als bei Patienten [4].
- Die HIV-Inaktivierung zeigte einen fast linearen Verlauf: nach ca. 30 min betrug die Temperatur im Hüftkopfinnen ca. 60 °C. Diese Temperatur erlaubt HIV noch eine kurze Überlebenszeit von Minuten. Die hohe Proteinkonzentration im Inneren der PCR-Röhrchen könnte diese verlängern. Nach 40 min war jedoch eine sichere Inaktivierung erreicht.
- Die Versuche wurden mit HIV-1 III B durchgeführt. Da zwischen HIV 1 und 2 bislang keine Unterschiede hinsichtlich der Hitzeinaktivierung im Plasma gefunden werden konnten, kann angenommen werden, daß auch andere HIV-Typen kein anderes Inaktivierungsverhalten bei Anwendung von Hitze haben.

- Der p24-Antigentest weist das innere Kernprotein von lebendem und inaktiviertem HIV nach. Die initiale Virussuspension hatte einen Titer von 10^{10} , entsprechend 1000 ng p24 Antigen. Die Grenze des Erkennens des Tests liegt bei 10 pg, also ein 100 000 Teil der Suspension [17]. Aus diesem Grund wurde die Sus-

pension von 40 und 62 min reaktiviert. Dies war ein weiterer Grund, die erreichten Werte von p24 nur als positiv anzusehen, wenn die Extinktion mehr als 1,5 betrug.

Die hier nachgewiesene HIV-Inaktivierung nach Durchführung des thermischen Desinfektionsverfahren im Lobator SD-1 hängt von der korrekten Handhabung des Systems und der Aufbereitung des Hüftkopfes ab. Der humane Hüftkopf muß von Weichteilen befreit und vollständig entknorpelt sein. Kortikale Halsanteile müssen reseziert sein. Der Desinfektionsvorgang darf nicht unterbro-

Tabelle 1
Literaturübersicht – thermische Inaktivierung von Viren

Autor	Virustyp	Virusfamilie	Temperatur [%]	Zeit
Lelie et al. [28]	Vaccinavirus	Pockenviren	65	15 min
	Enzephalomyokarditisvirus	Picornaviren	65	15 min
	Sindbisvirus	Togaviren	65	15 min
	Mäusehepatitisvirus	Coronaviren	65	15 min
	Influenzavirus	Orthomyxoviren	65	15 min
	Virus der vesikulären Stomatitis	Rhabdoviren	65	15 min
	Zytomegalievirus	Herpesviren	65	15 min
	HIV	Lentiviren	65	15 min
	Murines Leukämievirus	Retroviren	65	15 min
	Kaninchenparvovirus	Parvoviren	103	90 sec
	Phage phiX174	Phagen	103	90 sec
Nagumo et al. [32]	HIV	Retroviren	56	20–30 min
Charm et al. [6]	HIV	Retroviren	77	0.006 sec
	Virus der vesikulären Stomatitis	Rhabdoviren	77	0.006 sec
	Enzephalomyokarditisvirus	Picornaviren	77	0.006 sec
Spire et al. [38]	HIV	Retroviren	56	30 min
Gleeson et al. [11]	HIV	Retroviren	56	30 min
McDougal et al. [30]	HIV	Retroviren	60	24 sec
Hilfenhaus et al. [18, 19]	HIV	Retroviren	60	10 h
	Herpes-simplex-Typ I	Herpesviren	60	10 h
	Bovines Diarrhoeovirus	Flaviviren	60	10 h
	HCV		60	10 h
	Poliovirus	Picornaviren	60	10 h
	Hepatitis B		60	10 h

chen werden. Trotz der sicher nachgewiesenen HIV-Inaktivierung sollten aus ethischen und forensischen Gründen die Richtlinien zum Führen einer Knochenbank streng eingehalten werden. Der ersten HIV-Test beim Spender im Rahmen der Hüftkopffentnahme hat also bei der TEP-Operation zu erfolgen. Eine Zweitbestimmung von HIV nach 3 oder 6 Monaten ist empfohlen, scheint bei Thermoinaktivierung jedoch entbehrlich. Die Entnahme des Hüftkopfes muß im Operationsaal unter sterilen Bedingungen erfolgen. Der Desinfektionsvorgang für Viren und Bakterien ist nicht für an Leichen entnommene oder andere Knochentransplantate beispielsweise kortikale Transplantate getestet und damit nicht sicher.

Literatur

- American Association of Tissue Banks (1990) **Standards for tissue banking**. Am Assoc Tissue Banks Arlington VA
- Buck BE, Malinin TI, Brown MD (1989) **Bone transplantation and human immunodeficiency virus: an estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome AIDS**. Clin Orth Relat Res 204: 129 – 135
- CDC (1988) **Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations**. MMWR 37: 597 – 599
- Cao Y, Ho DD, Todd J et al. (1995) **Clinical evaluation of branched DNA signal amplification for quantifying HIV type I in human plasma**. AIDS Res Human Retrovir 11: 353 – 361
- Chapman PG, Villar RN (1992) **The bacteriology of bone allografts**. J Bone Joint Surg [Br] 74: 398 – 399
- Charm E, Landau S, Williams B, Horowitz B, Prince AM, Pascual D (1992) **High-temperature short-time heat inactivation of HIV and other viruses in human blood plasma**. Vox Sang 62: 12 – 20
- Eggen BM, Nordbo SA (1992) **Hepatitis-C and bone transplantation**. N Eng J Med 326: 411
- European Association of Musculo Skeletal Transplantation (1994) **Standards for Tissue Banking**. Copyright EAMST
- European Association of Tissue Banking (1995) **General Standards for Tissue Banking**. Copyright EATB
- v Garrel T, Garbas J, Knaepler H, Mutters R (1993) **Optimierung des mikrobiologischen Keimnachweises bei der allogenen Knochen transplantation**. In: Becker, Beger, Hartel (Hrsg) Chirurgisches Forum 93. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Gleeson M, Herd L, Burns C (1990) **Effect of heat inactivation of HIV on specific serum proteins and tumor markers**. Ann Clin Biochem 27: 592 – 594
- Gürtler L (1993) **Blood-borne viral infections**. Blood Coagul Fibrinol 5: [Suppl] 3
- Gürtler LG, Eberle J, Bader L (1994) **Transfusionsassoziierte HIV-Infektion**. Infusionsther Transfusionsmed 21 [Suppl 1]: 7 – 10
- Hahn H, Falke D, Klein P (1994) **Medizinische Mikrobiologie**. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Hallfeld KJ, Kessler S, Puhlmann M, Mandelkow H, Schweiberer L (1995) **Der Einfluß verschiedener Sterilisationsverfahren auf die osteoinduktiven Eigenschaften demineralisierter Knochenmatrix**. Unfallchirurg 95: 313 – 318
- Hart MM, Campbel KD, Kartub MG (1986) **Bone banking – A cost effective method for establishing a community hospital bone bank**. Clin Orthop 206: 295
- Hartmann M, Kühn J, Näher H, Doerr HW, Braun R (1987) **Bewertung des p-24 Antigennachweis in der Laboratoriumsdiagnostik der HIV-Infektion**. AIFO 8: 447 – 450
- Hilfenhaus J, Gregersen JP, Müller H, Nowak T, Pranter W (1991) **Inactivation of retroviruses in biologicals manufactured for human use. Symposium on virological aspects of the safety of biological products, London, England 1990**. Develop Biol Standard 75: 159 – 169
- Hilfenhaus J (1989) **Experimental data on virus safety of factor 8**. Symp Recent Advances in Hemophilia treatment. Wien, 1989
- Horsburgh CR, Ou CY, Jason J et al. (1989) **Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody**. Lancet 2: 637 – 640
- Jerosch J, Castro WHM, Granrath M, Rosin H (1990) **Knochenbanken in der BRD**. Unfallchirurg 93: 334 – 338
- Jilg W (1994) **Hepatitis B – Bedeutung für die Transfusionsmedizin**. Infusionsther Transfusionsmed [Suppl] 1: 20 – 26
- Kakaiya R, Müller WV, Gudino M (1991) **Tissue transplant-transmitted infections**. Transfusion 31: 277 – 284
- Knaepler H, v. Garrel T, Seipp HM, Ascherl R (1992) **Experimentelle Untersuchungen zur thermischen Desinfektion und Sterilisation allogener Knochen transplantate und deren Auswirkung auf die biologische Wertigkeit**. Unfallchirurg 95: 477 – 484
- Knaepler H, v. Garrel T, Güntler L (1994) **Die allogene Knochen transplantation – eine aktuelle Standortbestimmung**. Dtsch Ärzteblatt 91: 696 – 700
- Knaepler H, v. Garrel T, Gotzen L (1994) **Untersuchungen zur Desinfektion und Sterilisation allogener Knochen transplantate**. Hefte Unfallchir 235
- Kühne JH, Refior HJ (1993) **Möglichkeiten zur HIV-Inaktivierung homologer Knochen transplantate**. Unfallchirurgie 19: 313 – 317
- Lellie PN, Reesink HW, Lucas CJ (1987) **Inactivation of 12 viruses by heating steps applied during manufacture of a hepatitis B vaccine**. J Med Virology 23: 297 – 301
- Malinin TI (1992) **Acquisition and banking of bone allografts**. In: Habal MB, Reddi AH (eds) Bone substitutes. Sanders, Philadelphia
- McDougal JS, Martin LS, Cort SP, Mozen M, Heldebrant CM (1985) **Thermal inactivation of the acquired immunodeficiency syndrome virus, human T lymphotropic virus-III/lymphadenopathy-associated virus, with special references to antihemophilic factor**. J Clin Invest 76: 875 – 877
- Mitscherlich E (1984) **Microbiol survival in the environment**. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Nagumo T, Takeuchi Y, Hoshino H (1992) **Inhibition of heat inactivation of reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type I by seropositive sera**. Jpn J Cancer Res 83: 594 – 600
- Resnick L, Veren K, Salahuddin SZ, Tondreau S, Markham PD (1986) **Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments**. J Am Med Ass 255: 1887 – 1891
- Ranki A, Valle SL, Krohn M et al. (1987) **Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human-immunodeficiency-virus infection**. Lancet I: 589 – 593
- Roggendorf M (1994) **Bedeutung der HCV-Infektion für die posttransfusionelle Hepatitis**. Infusionsther Transfusionsmed [Suppl] 1: 12 – 18
- Shutkin NM (1954) **Homologous serum hepatitis following the use of refrigerated bone**. J Bone Joint Surg [Am] 36: 160 – 162
- Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL (1992) **Transmission of human immunodeficiency virus type I from a seronegative organ and tissue donor**. N Engl J Med 32: 726 – 732
- Spire B, Dormont D, Barré-Sinoussi F, Montagnier L, Chermann JC (1985) **Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by heat, gamma rays, and ultraviolet light**. Lancet II: 188 – 190
- Strong DM (1994) **Report of transmission of Hepatitis C by bone transplantation**. 17th Annual Meeting – American Association of Tissue Banks (AATB) 22. – 25.10.1993, Boston – USA
- Tjøtta E, Hungnes O, Grinde B (1991) **Survival of HIV-1 activity after disinfection, temperature and pH changes, or drying**. J Med Virology 35: 223 – 227

41. Tomford WW (1993) **Surgical bone banking.** In: Tomford WW (ed) Muskuloskeletal tissue banking. Raven Press, New York
42. Wagner N (1994) **Untersuchungen zur Thermolabilität humanpathogener Viren unter besonderer Berücksichtigung der allogenen Spongiosatransplantation.** Inaugural Dissertation, Marburg
43. Wallhäuser KH (1988) **Praxis der Sterilisation-Desinfektion-Konservierung.** Thieme, Stuttgart
44. Wilmes E, Gürtler L, Wolw H (1987) **Zur Übertragung von HIV-Infektionen durch allogene Transplantate.** Laryngol Rhinol Otol 66:332–334
45. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer. **Richtlinien zum Führen einer Knochenbank.** Dtsch Arztlblatt 87: 41–45
46. Yamato K, Taguchi H, Yoshimoto S et al. (1986) **Inactivation of lymphocyte-transforming activity of human T-cell leukemia virus type I by heat.** Cancer Res 77: 13–15
47. Zeichhardt H, Scheiermann N, Spicher G, Deinhardt F (1987) **Stabilität und Inaktivierung des HIV.** Bundesgesundhbl 30: 172–177

F. Decker

Führen im Rettungsdienst

2., überarb. Aufl.; Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1996. 227 S., 98 Abb., (ISBN 3-540-61064-8), geb., DM 78,-

Führen ist ein Ausdruck, der in der Aus- und Weiterbildung von Managern von zentrale Bedeutung hat. Man versteht darunter ein Verhalten, das darauf ausgerichtet ist auf Andere so einzuwirken, daß sie zielorientiert (und im Sinne des Führenden) handeln. Verstand man früher unter Führung vor allem etwas wie: „Befehlen“ oder zumindest „Anordnen“, so steht heute der fördernde und begleitende Aspekt gegenüber dem Mitarbeiter zur optimalen Aufgabenerledigung im Vordergrund des Führungsverhaltens. Damit ist „Führen“ eng mit „Motivieren“ gekoppelt, einem Begriff, der aus keiner Unternehmensleitung mehr wegzudenken ist.

Führen ist auch und gerade im Rettungsdienst vielerorts erforderlich. Besonders naheliegend die Aufgabe der „Führung im Einsatz“, wenn unter Zeitdruck und in einem dynamischen Geschehen hohe Leistungsanforderungen gegeben sind und durch den bestmöglichen Einsatz der Ressourcen die Aufgaben gelöst werden müssen. Das Buch stellt systematisch und umfassend die im Rettungsdienst relevanten Teilbereiche des Führens: – Personenorientierte Aufgaben, – Umfeld- und Sachgestaltung sowie – Handlungs- und Beziehungsgestaltung vor Ort und in der Rettungsleitstelle dar. Neben mehr grundlegenden Darstellungen werden auch sehr detailliert die Führungserfordernisse und Phasen der Abläufe im Einsatz (Auftragserteilung und Zielsetzung, Situationsanalyse und Lagefeststellung, Planung, Entscheidung, Durchführung, Ausführung und Kontrolle) dargestellt und aufgearbeitet.

Breiten Raum nehmen die Abschnitte über Erfordernisse und Möglichkeiten einer zeitgemäßen Menschenführung im Rettungsdienst insgesamt ein. Hier geht es weniger um die akute Lösung konkre-

ter Probleme im Einsatz, sondern um die elementaren Probleme der Personalführung in dem Dienstleistungsunternehmen Rettungsdienst, das mit seinen vielen Vorgaben und Interaktionen besondere Anforderungen an die hier tätigen Führungspersonen stellt. Der Autor beschränkt sich dabei nicht auf theoretische Empfehlungen, sondern leitet aus den Darstellungen der Führungsstile, -verhalten und -persönlichkeiten seine „Führungslehre“ ab und formuliert konkret nachvollziehbare Regeln für eine erfolgreiche Menschenführung und den bestmöglichen sozialen Umgang miteinander ab.

Naturgemäß erscheint der Stil eines solchen Lehrbuches mit alltagsfernem scheinendem Inhalt dem Rettungsdienstpraktiker zunächst fremd und unverständlich. Er würde sich an vielen Stellen noch einfachere und bildhaftere Darstellungen mit weniger ungewohnten Fachbegriffen wünschen. Dennoch bleibt festzuhalten, daß sich der Autor erfolgreich der Aufgabe gewidmet hat, eine sehr abstrakte Thematik gezielt aufzuarbeiten. So sind vielfältig Beispiele aus dem Rettungsdienst-Alltag eingefügt, die auch dem hier weniger Vorgebildeten den Einstieg erleichtern können. Etwas unverständlich ist die sprachliche Beschränkung auf Rettungssanitäter (nachdem seit Jahren der Rettungsassistent gesetzlich etabliert ist) und die größere Zahl von Druckfehlern, die in einer Neuauflage eines seit Jahren etablierten Buches nicht zu erwarten wären.

Das Buch ist Pflichtlektüre aller Führungs- und Leitungskräfte im Rettungsdienst. Vor allem die mit der Organisation und Durchführung von Zusatzaufgaben in den Hilfsorganisationen betrauten Mitarbeiter finden in dem Buch grundlegende und weiterführende Empfehlungen und Regeln, die ihnen vielfältig nutzen werden.

R. Rossi (Ansbach)