



ADVIES VAN DE HOGE GEZONDHEIDSRAAD nr. 8785

Inactivatie en securisatie van weefsels en cellen ten overstaan van bacteriën, virussen of prionen

Deel III: virologie

Viral inactivation and securisation of tissues and cells for safe human use Part III: virology

7 November 2012

EXECUTIVE SUMMARY

Dit advies heeft als doel de risico's verbonden aan de overdracht van virussen door middel van weefsel- en celtransplantatie toe te lichten. De Hoge Gezondheidsraad (HGR) belicht vooreerst virale kenmerken en aandachtspunten met betrekking tot weefsel/cel transplantatie.

Virussen zijn obligaat intracellulaire parasieten (Hfdst 3: Definitie, classificatie en algemeenheden). Zij zullen zich enkel vermenigvuldigen binnen een cel. Het virus bestaat essentieel uit een genetische code o.v.v. een nucleïnezuurstreng binnen een structuur die het toelaat veilig van cel tot cel en van gastheer tot gastheer te migreren. Virussen werden eerst in de XIX^e eeuw ontdekt als infectieuze agentia met als bijzondere eigenschap het feit dat ze doorheen bacteriële filters kunnen dringen. Ze zijn zeer klein, ze vermenigvuldigen zich, ze worden samengesteld uit hun verschillende componenten (nucleïnezuur, enzymen, en structurele eiwitten), ze bevatten één enkel soort nucleïnezuur (DNA of RNA), ze zijn strikt afhankelijk van het metabolisme van een cel, en ze zijn cel- en dus gastheerspecifiek.

Een eerste belangrijk punt bij de transmissie van virussen via bloed, weefsels of organen is de duur van de infectie. Virussen die een chronische infectie veroorzaken betekenen een belangrijker risico dan virussen die slechts korte tijd aanwezig zijn tijdens een acute infectie. Dit is des te meer van belang wanneer het virus in bloed of sommige weefsels aanwezig is. De belangrijkste virussen in dit verband zijn Humaan immunodeficiëntievirus (HIV), hepatitis B virus (HBV) en hepatitis C virus (HCV). Virussen zoals het HTLV (*Human T-cell lymphotropic virus*) en sommige *Herpesviridae* zoals het cytomegalovirus (CMV) veroorzaken tevens chronische, dikwijls levenslange infecties.

Een tweede probleem is de aanwezigheid van een min of meer lange incubatieperiode bij de meeste van deze virussen. Tijdens deze incubatie is er een periode tijdens dewelke nog geen antistoffen aanwezig zijn (gemakkelijk op te sporen) maar wel reeds infectieus virus (moeilijker op te sporen bvb. met *Nucleic Acid Amplification Testing* (NAT testing)), terwijl de persoon volledig asymptomatisch kan zijn.

Virussen zijn onderhevig aan een belangrijke genetische variatie, vooral de ribonucleic acid (RNA) virussen. Dit brengt met zich mee dat na infectie de persoon stilaan besmet is met een mengsel van diverse mutanten die min of meer gaan afwijken van het oorspronkelijke virus. Fylogenetische analyse laat toe het verwantschap tussen virussen na te gaan en zo een idee te krijgen van de mogelijke besmettingsbron.

Sommige virussen zoals CMV en HTLV zijn strikt celgebonden en worden dus overgedragen via leukocyten rijke weefsels of cellen. Donoren van levende, leukocyten rijke weefsels/cellen zoals bv. hematopoëtische stamcellen of semen worden dus best getest voor CMV en HTLV. Voor donoren van cornea, sclera, huid, bot, pezen, ligamenten, kraakbeen, hartkleppen, dura mater, en oöcyten is dit daarentegen niet nodig.

Om een virale infectie te diagnosticeren maakt men gebruik van serologische testen (uitgevoerd op een bloedmonster van de donor) als zijnde medische hulpmiddelen voor in vitro diagnose ofwel met Europese gemeenschap label (EG) ofwel daartoe gevalideerd (Hfdst 4: Diagnose van virale infecties). Pre-analytische factoren die de kwaliteit van het serologisch resultaat zullen bepalen, zijn onder meer het type donor (*Heart-beating* en *non-heart beating* donoren, kadaver donoren en levende donoren) en al dan niet aanwezigheid van hemodilutie. Postmortem stalen kunnen hemolyse vertonen, wat de specificiteit van de assay kan compromiteren. Anderzijds kunnen aanwezige inhibitoren in postmortem bloed aanleiding geven tot vals negatieve resultaten. Hemodilutie kan een negatieve invloed uitoefenen op de gevoeligheid van de test. Stalen andere dan serum of plasma, zijnde andere vloeistoffen of secreta zoals kamervocht of glasvocht worden enkel toegelaten indien dit uit klinisch oogpunt gerechtvaardigd is en er in dat geval een gevalideerde test voor deze staalsoort gebruikt wordt.

In de screening naar infectieuze agentia mogelijks aanwezig in donorbloed, wordt er getest voor HIV, HBV, HCV, en in specifieke situaties HTLV.

In België werd de incidentie van **HIV**-positieve bloeddonoren in 2011 0,8/100.000. Een reactieve screeningsassay (*enzyme immuno assay* – EIA) vereist een confirmatie test (bv. Western blot). Het Koninklijk Besluit (KB) van 28/09/2009 schrijft als minimum vereiste test bij levende donoren anti-HIV 1-2 antistoffen voor en daarenboven dient bij overleden donoren ook een HIV NAT uitgevoerd te worden tenzij men een gevalideerde inactiveringsstap voor het betrokken virus includeert. Bovendien kan NAT een tweede serologische controle na 6 maanden vervangen voor *levende* donoren.

Hepatitis B surface antigen (HBsAg) is de serologische merker voor overdraagbare **hepatitis B infectie**. De incidentie van HBV was in België onder bloeddonoren in 2011, 0,8/100.000. Antistoffen (As) tegen het core antigeen (anti-HBc As) zijn aanwezig in het serum 1-2 weken na verschijnen van HBsAg en gaan het verschijnen van As tegen het oppervlakte antigeen (anti-HBs As) weken of maanden vooraf. Terwijl HBsAg detecteerbaar wordt 60 dagen na HBV infectie, toont *Polymerase chain reaction* (PCR) HBV partikels 25 dagen vroeger aan in het bloed.

Indien de anti-HBc As test reactief is met een negatieve HBsAg test, worden anti-HBs As bepaald. Indien anti-HBs As positief zijn, kan men ervan uit gaan dat de donor hersteld is van een vroegere infectie en dat het weefsel bijgevolg kan gebruikt worden. Het KB van 28/09/2009 eist bij *levende* donoren HBsAg en anti-HBc As en daarenboven dient bij *overleden* donoren ook een HBV NAT uitgevoerd te worden tenzij men een gevalideerde inactiveringsstap voor het betrokken virus includeert. Bij *levende* donoren schrijft het KB en de EU voor dat ofwel serologische testen herhaald worden na 6 maanden, ofwel HBV NAT uitgevoerd wordt op het initiële staal (ter vervanging van het tweede bloedmonster). Herhalingstesten kunnen ook vervallen wanneer de bewerking een gevalideerde inactivering van HBV omvat.

Anti-HCV As duiden op een infectie met het **hepatitis C virus**, terwijl exclusie van een viremie enkel met behulp van HCV-PCR kan aangetoond worden. HCV-viremie treedt 20 dagen na infectie op, terwijl het gemiddeld 80 dagen duurt totdat anti-HCV As gevonden kunnen worden. Elke anti-HCV As positieve donor moet als infectieus beschouwd worden ongeacht de resultaten van een HCV-PCR, totdat confirmatie testen HCV infectie uitsluiten. De incidentie van HCV onder Belgische bloeddonoren was in 2011 0,8/100.000. Het KB van 28/09/2009 schrijft als minimum vereiste test bij *levende* donoren anti-HCV As voor en daarenboven dient bij *overleden* donoren ook een HCV NAT uitgevoerd te worden tenzij men een gevalideerde inactiveringsstap voor het betrokken virus includeert. NAT laat toe de tweede serologische controle na 6 maanden bij

levende donoren te laten vallen voor HCV. Herhalingstesten kunnen ook vervallen wanneer de bewerking een gevalideerde inactivering van HCV omvat.

HTLV-1 infectie kan leiden tot neurologische ziekte: HTLV-geassocieerde myelopathie of tropische spastische paraparese en adulte T-cel leukemie na een latentieperiode van jaren tot decaden. HTLV-2 is nog niet geassocieerd geweest met een ziekte. In België was de prevalentie van HTLV I 0,2/1000 zwangeren, en van HTLV II 0,6/1000 zwangeren. De geschatte seroprevalentie in Europa voor HTLV is 1-7/100.000 inwoners. De EU en het KB van 28 september 2009 bevelen aan om HTLV As te testen bij donoren die komen uit een gebied met een hoge incidentie van HTLV of met seksuele partners of ouders uit een dergelijk gebied. Ondanks een sensitieve en specifieke screeningstest voor HTLV-I/II komen vals-positieven voor in gebieden met lage prevalentie (zoals bv. België). Een confirmatie Western Blot is niet tijdig voor orgaantransplantatie maar misschien wel te overwegen voor weefseltransplantatie.

Andere specifieke infectieuze agentia waarvoor donorscreening mogelijk uitgevoerd wordt, afhankelijk van de prevalentie in een regio zijn bv. West-Nile virus, en *Severe acute respiratory syndrome* (SARS). Noch de Europese richtlijn, noch het KB van 28 september 2009 vermelden **West-Nile virus** bij de eventueel te testen virussen.

De mogelijkheid op transmissie van **SARS** via bloed, cellen en weefsels is niet duidelijk. Personen met SARS zouden potentieel viremisch kunnen zijn voor de onset van de symptomen en na de resolutie ervan. Transmissie van SARS via cellen en weefsels gepreleveerd tijdens deze fase is mogelijk. Het is raadzaam outbreaks op te volgen en afhankelijk daarvan SARS-screening al dan niet te includeren.

Van alle **testen** die ontwikkeld werden om virale infecties te diagnosticeren, is de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (**ELISA**)-test de meest gebruikte om op grote reeksen seramonters antistoffen te bepalen (**screening** test). Voor HIV Ag/As, HBs Ag, anti-HBc As, anti-HBs As, en anti-HCV As wordt in vele centra een ELISA gebruikt. In de eerste generatie-ELISA tests werd het lysaat van viraal geïnfecteerde cellen als antigeen gebruikt. Klonering van nucleotidesequenties heeft het mogelijk gemaakt om op succesvolle wijze antigenische polypeptiden van het virus te maken, via recombinant deoxyribonucleic acid (DNA)-technologie en chemische synthese. Dit zijn de tweede generatie ELISA-tests die minder vals-positieve resultaten geven.

De overgrote meerderheid van de ELISA-testen streven een zo hoog mogelijke sensitiviteit na (bv. het vermogen van een test om HIV positieven op te sporen). De specificiteit (bv. het vermogen van een test om HIV negatieven op te sporen) van de screeningstesten is dan ook lager (86,5 % - 100 %). Daaruit volgt dat de meeste screeningstesten wel in staat zijn om HIV positieven op te sporen, maar tevens een aantal personen die niet besmet zijn met HIV als positief zullen beoordelen.

In populaties met een lage ziekteprevalentie (bv. België) moet een positief screening testresultaat steeds bevestigd worden door een andere test die minstens even gevoelig en een hogere specificiteit heeft dan de screeningstest. Deze testen worden **confirmatietesten** genoemd.

De Western Blot, een vaste-fase immuno-assay, is tot op heden de meest gebruikte confirmatietest. In deze test worden individueel gescheiden structurele **virale eiwitten**, die als individuele banden aanwezig zijn op een nitrocellulose strip, geïncubeerd met het serum van de patiënt. Antistoffen uit het patiëntenserum die gebonden werden op de individuele virale eiwitten worden aangetoond met een enzyme-gemerkt anti-humaan immunoglobuline G conjugaat dat na toevoegen van een geschikt substraat, aanleiding zal geven tot het ontstaan van een gekleurd bandenpatroon. Deze assays zijn zeer sensitief en voornamelijk zeer specifiek, maar zijn technisch veeleisend, relatief duur en vatbaar voor interpretatie gezien er in de regel subjectieve beoordeling plaatsvindt.

De lijnimmuno-assays (LIA) zijn tweede generatie confirmatietesten. Zeer goed gekarakteriseerde individuele recombinante virale proteïnen en/of synthetische peptiden worden in gecontroleerde hoeveelheden op mechanische wijze in lijnvorm aangebracht op een

stripvormig dragermateriaal. Deze strips zijn beter aflees-, interpreteer- en standaardiseerbaar dan Western blots.

Immunofluorescentie assays en radio-immunoprecipitatie testen zijn andere zeer gevoelige en specifieke testen.

Een andere wijze van confirmatie kan men bekomen door **viraal DNA/RNA** aan te tonen.

Heden zijn er *Food and Drug Administration* (FDA)-goedgekeurde NAT toepasbaar op bloedstalen van zowel levende als kadaverdonoren. Er zijn triple NAT testen voor HIV, HCV en HBV bepaling op bloed (serum/plasma) op geautomatiseerde platforms. Deze systemen zijn reeds in routine gebruik in bloedbanken en werden ook gevalideerd voor gebruik voor de screening van weefseldonoren, inclusief het testen op postmortem bloed.

PCR is bedacht in 1983 als een middel om *in vitro* DNA te amplificeren met behulp van DNA polymerase. PCR technologie heeft de snelle en sensitieve detectie van een brede waaier van klinisch relevante virussen, inclusief RNA virussen via reverse transcriptie PCR, vergemakkelijkt.

De twee meest toegepaste technieken van *target amplificatie* zijn nucleïnezuur sequentie gebaseerde amplificatie en transcriptie gemedieerde amplificatie.

Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) is een alternatief voor PCR voor de analyse van nucleïnezuren en is meest geschikt voor de amplificatie van RNA en daardoor ook een krachtige techniek voor de detectie van **viraal RNA** zoals het HCV of HIV-1.

Transcriptie gemedieerde amplificatie is een variant van de NASBA techniek die de ribonuclease H (RNaseH) activiteit van het reverse transcriptase (RT) aanwezig in de reactie gebruikt in plaats van een specifiek enzym (RNaseH).

De *signaal amplificatie* techniek met branched DNA heeft bewezen een van de meest veelzijdige signaal amplificatie systemen te zijn tot op heden. Signaalamplificatie met branched DNA incorporeert verschillende simultane hybridisatie stappen die verschillende types van oligonucleotide probes (capture probes, target probes, secundaire branched probes, korte enzyme-gelinkede tertiaire probes) gebruikt. De gevoeligheid van branched DNA assays is over het algemeen lager dan deze die kan bereikt worden met target amplificatie methodes.

Bij het nemen van een staal voor genetische analyse is het belangrijk het **staal stabiel** te houden. Dit is vooral kritisch voor RNA. RNAsen zijn overal aanwezig en verminderen de gevoeligheid van de PCR. Niet-gestabiliseerde stalen moeten snel ingevroren worden en verstuurd worden op droog ijs. Stalen voor DNA onderzoek dienen best bewaard in 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5-8.0 en 4°C. Stalen voor RNA-analyse moeten in gebufferd medium bij -20°C ingevroren worden. Heparine kan de DNA-amplificatie remmen of inhiberen tijdens PCR. Er zijn heel wat studies gebeurd over de stabiliteit van HIV, HCV en HBV in verschillende afnamebuizen (plasma, serum), onder verschillende temperaturen en gedurende verschillende tijden. De resultaten hiervan zijn niet steeds concordant.

Terwijl er in de USA ongeveer 150.000 botallogreffes gebruikt worden per jaar, is de **transmissie van infecties** via botallogreffes zeer zeldzaam om verschillende redenen (Hfdst 5: Inventaris publicaties: transmissie van virale infecties door weefsels). Er is

- de lage prevalentie van HIV, HCV en HBV onder donoren van menselijk lichaamsmateriaal,
- de zorgvuldige screening van donoren en
- de verwerking van lichaamsmateriaal met maximale verwijdering van bloed, beenmerg en andere weefselresten.

HIV, HCV of HBV transmissie via cornea of cardiovasculaire weefsels is ongewoon, waarschijnlijk omdat cornea een avasculair weefsel is en cardiovasculaire weefsels verwerkt en getransplanteerd worden in lage aantallen.

De meeste gevallen van transmissie van virale aandoeningen dateren uit een tijdperk waarin er nog geen serologische testen beschikbaar waren voor HBV, HCV en HIV.

Twee gevallen van **HBV** infectie werden beschreven ten gevolge van een keratoplastie. Sommige auteurs konden HBV aantonen in cornea weefsel van HBsAg positieve donoren,

anderen niet. Shutkin beschreef in 2005 als eerste een patiënt die een ongeproceste gekoelde corticale botgreffe kreeg en 10 weken later hepatitis ontwikkelde. De capaciteit van humane hartkleppen om HBV over te dragen werd aangetoond in een studie van 31 patiënten die hartkleppen ontvingen van HBsAg positieve donoren. Tweeëntwintig receptoren waren immuun of HBsAg positief voor de transplantatie. Van de negen gevoelige patiënten aan HBV, ontwikkelde er één positieve HBV merkers.

Overdracht van **HCV** via al dan niet geproceste (met antibiotica, alcohol en detergenten) botallogreffes werd beschreven door Eggen en Nordbo, Conrad *et al.*, Homan *et al.* en Pereira *et al.*

In juni 2002 beschreef Homan een reeks casussen met overdracht van hepatitis C via de weefsels van eenzelfde donor met een 40-tal receptoren. Alle weefsels waren behandeld met oppervlakte chemicaliën of antibiotica. Botgreffes werden eveneens bestraald. Onder de receptoren waren er 8 casussen: 3 van de 6 patiënten die organen gekregen hadden, 1 receptor van een vena saphena (totaal aantal vena saphena receptoren $n = 2$), 1 van de receptoren van een peesgreffe ($n = 3$) en 3 receptoren van pees-met-botgreffes ($n = 3$) werden geïnfecteerd. Onder de receptoren van huid ($n = 2$) of bestraald bot ($n = 16$) was er geen transmissie.

HCV werd totnogtoe niet overgedragen via huidallogreffes, maar HCV RNA werd aangetoond in huidallogreffes door Conrad *et al.*

HCV genomen werden aangetoond in corneas. Nochtans kon een grootschalige studie van de *Eye Bank Association of America* geen enkele casus vinden van HCV transmissie onder de meer dan 400.000 getransplanteerde corneas (waarvan de donoren serologisch getest werden).

Experimenteel onderzoek toonde aan dat **HIV** in botten en pezen kan teruggevonden worden. Levend HIV virus werd geïsoleerd uit botten, beenmerg, en pezen van patiënten met aids. Dit veronderstelt de mogelijkheid op transmissie van HIV via weefseltransplantatie. Er zijn verschillende casussen gepubliceerd van HIV transmissie via weefseltransplantaties: receptoren van bewerkte en onbewerkte botallogreffes, pezen, huid (1 casus), vrouwen die kunstmatige inseminatie kregen. Het is onwaarschijnlijk dat HIV kan overgedragen worden via cornea's vermits dit orgaan bloedcel infiltratie verhindert. Hoewel HIV geïsoleerd werd uit tranen, corneaal weefsel, oogkamervocht, en conjunctivaal epitheel, trad er geen HIV transmissie op bij patiënten die een cornea transplant kregen van een HIV-seropositieve donor.

Sanzen *et al.* publiceerden de enige casus van **HTLV-1** transmissie na transplantatie van een diepgevrozen onbewerkte femurkopallogrefte.

Transmissie van rabies werd gerapporteerd bij **cornea**-receptoren. Het is geweten dat ogen rabies virus kunnen bevatten in geïnfecteerde dieren en mensen.

CMV werd overgedragen via cornea en huid.

Cornea geassocieerde transmissie van **herpes simplex virus** (HSV) is mogelijks een probleem, geïsoleerde gevallen van klinisch relevante transmissie werden gerapporteerd.

Cardiotrope virussen zoals CMV, parvovirus B19, enterovirus, en adenovirus worden veel meer gedetecteerd dan HCV, HBV of HIV en zijn het onderwerp van onderzoek naar hun impact in geval van transmissie in cardiovasculaire allogreffes.

Ter **preventie** van de mogelijke **overdracht van een virale infectie** kan men verscheidene pistes bewandelen (Hfdst 6: Preventie virale infecties).

Het medisch dossier wordt geanalyseerd op algemene exclusiecriteria voor weefsel/celdonatie, risicofactoren die tot exclusie voor donatie leiden (medische en persoonlijke anamnese indien mogelijk), klinische en fysische evidentie (lichamelijk onderzoek) zal nagegaan worden voor relevante overdraagbare aandoeningen. Serologische testen al dan niet aangevuld met NAT testen worden aanbevolen door zowel de HGR, de Europese Directive als het KB.

Er kunnen een hele reeks **decontaminerende/desinfecterende** of **steriliserende** middelen ingezet worden om de potentiële virale contaminatie van menselijk lichaamsmateriaal zo klein mogelijk te maken (Hfdst 7: desinfectie – sterilisatie).

Mechanische processing van botweefsel (verwijderen van resten weke weefsels, periosteum, bloed en beenmerg) reduceert reeds het risico op transmissie van potentiële pathogenen zoals aangetoond werd door Simonds: drie receptoren van ongeprocest bot werden geïnfecteerd met HIV-1 door de transplantatie van een botfragment van een HIV-1 positieve donor. De 3 receptoren van gelyofiliseerd bot, de 25 receptoren van met ethanol behandeld bot en de receptor van vers ingevrozen bot waaruit beenmerg verwijderd was, waren negatief voor HIV-1. Dit beklemtoont het belang van, zelfs minimale, processing van bot.

Processing methodes kunnen onder andere ook includeren dat men onder hoge druk spoelt met steriel water, onderdompelt in alcohol en deproteïnerende behandelingen doorvoert. Deze methodes betekenen echter geen terminale sterilisatie. Demineralisatie van corticaal bot lijkt enkele virussen (katten- leukemievirus, HIV, CMV, poliovirus, eenden HBV) te inactiveren in een drietal studies.

Voor wat de **chemische behandeling** betreft, bespreken we de performantie van peroxiden, chlorhexidine, chloordioxide, alkylerende agentia, organische kwikantiseptica, alcoholen, jodium en jodoforen, oppervlaktespanningsverlagende middelen, biocleanse en superkritische CO₂.

Aan **Perazijnzuur** (PAA) werd een sterke antivirale activiteit toegeschreven, afhankelijk van de concentratie, pH en expositietijd. De dosISRANGE is wijd voor de verschillende virussen. Een concentratie van 0,1 % perazijnzuur gecombineerd met glycerol 85 % heeft geen nadelige effecten op de biocompatibiliteitseigenschappen van huid. Er werden geen studies met viraal geïnfecteerde huid teruggevonden. Behandeling van in viruscultuur gesuspendeerde spongiosa kubusjes met 1 % PAA in 24 % ethanol gedurende 4 u op kamertemperatuur bij lage druk (200 mbar) toonde een meer dan 4 log₁₀-reductie van de virusinfectiviteit voor pseudorabies virus, runder diarree virus, varkens parvovirus en poliovirus. HIV-II inactiverde spontaan in de PAA test kubusjes maar ook in de controles. HAV kon enkel geïnactiveerd worden door de ontvetting met een chloroform/methanol mengsel (7 log₁₀-reductie), terwijl er na PAA behandeling slechts een RNA reductie was van 2,9 log₁₀.

0,1 % PAA (met 25 % ethanol gebruikt gedurende 15 minuten bij 20°C) heeft een antiviraal effect op HSV-I en poliovirus type I van meer dan 2 log₁₀ reducties. Deze lagere concentratie bleek effectief te zijn als desinfectans en had weinig effecten op de biomechanische of morfologische eigenschappen van behandelde hartkleppen 6 maanden na implantatie ervan bij schapen.

De infectiviteit van sommige lipofiele virussen (bv. virussen met enveloppe zoals influenzavirus, HSV, HIV) is snel geïnactiveerd met **chlorhexidine**, hoewel waterige chlorhexidine oplossingen niet actief zijn tegen de kleine proteïne-gecoate virussen (inclusief vele enterische virussen, poliovirus, papillomavirus – virussen zonder enveloppe). Een *in vitro* studie confirmeerde het effect van chlorhexidine 4 % (15 sec applicatie) op HIV. Een 2-4 % chlorhexidine behandeling is echter schadelijk voor weefsels zoals cornea, bot en pezen.

Chloordioxide inactiveret enterovirussen, poliovirussen, rotavirus en HIV. De inactivatie van poliovirus is meer efficiënt bij een pH van 10,0 dan bij pH 6,0 en blijkt gerelateerd te zijn met de concentratie chloordioxide. Chloordioxide behandeling werd voorgesteld om het risico van ziekteoverdracht via de transplantatie van sclera en cornea te verminderen. Chloordioxide behandeling gedurende 10 minuten op met HSV type I en poliovirus type I gecontamineerd myocardweefsel reduceerde de virustiter van beide virussen met ongeveer 3 log₁₀. Er waren slechts lichte wijzigingen in de endotheelcellen van hartkleppen die deze behandeling ondergingen.

In de gewone gebruiksconcentratie van 1 % is **formaldehyde** sterk virucide. Formaldehyde is toxisch en mutageen. Formaldehyde 4 % in combinatie met cialit (Natrium-2-ethylmercurimercaptobenzoxazole-5-carboxylzuur) 1:5.000 doodt HIV aanwezig in gehoorbeentjes van HIV positieve patiënten. Ook kon HIV in gelyofiliseerde dura maters geïnactiveerd worden met (24 uren behandeling) paraformaldehyde 0,05 %.

Glutaraldehyde is een van de weinige agentia die HIV kan inactiveren in aanwezigheid van bloed en wanneer het virus beschermd werd door associatie met cellen en celmembranen. Glutaraldehyde is zoals formaldehyde toxisch voor alle levende cellen. Deze techniek leidt snel tot falen van humane hartkleppen omwille van klepdegeneratie en klepruptuur.

Het organisch kwikantisepticum Cialit heeft weinig of geen antivirale eigenschappen. Organische kwikverbindingen zijn ook niet geschikt voor de bewaring van botallogreffes omwille van hun toxiciteit.

Ethanol is actief tegen lipofiele virussen met enveloppe, maar niet tegen hydrofiele virussen. Omdat bepaalde virussen niet geïnactiveerd worden, blijft er een element van onzekerheid indien ethylalcohol als enige desinfectie procedure toegepast zou worden bij allogreffes.

De osteoinductieve eigenschappen van botmatrix worden niet aangetast door ethanol, echter wel de osteogene eigenschappen van gemineraliseerd corticaal bot. In de *case-report* van Simonds waarbij drie receptoren geïnfecteerd werden met HIV-1 via onverwerkte diepgevroren botallogreffes van een HIV-1 besmette donor, waren er ook andere botfragmenten vrijgegeven die gelyofiliseerd werden en nadien behandeld met ethanol. Geen van deze botfragmenten gaf aanleiding tot de overdracht van HIV-1. Ethanol 70 % (v/v) samen met 0,02 % chlorhexidine inactieveert het HIV-virus in humane pezen.

Een concentratie van 0,8 % (w/v) **iodine** inactieveert HIV in de aanwezigheid van bloed binnen 1 minuut. Celvrij HIV wordt geïnactiveerd na 30 tot 60 seconden blootstelling aan 0,5 % (w/v) PVP-I. Povidone-iodine tast osteo-inductiviteit aan, en PVP-I 10 % is erg irriterend voor vasculair endotheel, nl. met secundaire trombose.

Quaternaire ammoniumderivaten zijn goede desinfectantia voor celvrij HIV. Zij hebben echter geen goede activiteit op virussen zonder enveloppe en hun werking daalt in aanwezigheid van organisch materiaal.

BioCleanse® Tissue Sterilisation Process is een lage-temperatuur chemische sterilisatiemethode dat o.a. virussen met en zonder enveloppe elimineert op de botoppervlakte en in het bot. Er wordt gebruik gemaakt van niet nader bepaalde detergents en steriliserende agentia die de weefselsterkte en biocompatibiliteit vrijwaren.

Superkritische CO₂ heeft een grote 'solvent' capaciteit, en een hoge diffusie capaciteit: ideaal om substanties uit poreuze matrices zoals botten te krijgen. De meest resistente virussen (zoals parvovirus) aanwezig op femurkoppen kunnen geïnactiveerd worden met het superkritische CO₂ proces. HIV-1, sindbisvirus, poliovirus en pseudorabiesvirus werden met meer dan 6-log₁₀ geïnactiveerd volgens deze procedure. Allogene botten geïmplanteerd bij schapen na superkritische CO₂-behandeling integreerden goed.

Ethyleenoxide is een gas met een hoog penetratievermogen. Ethyleenoxide kan chemisch resistente virussen inactiveren zoals enterovirussen, poxvirus en parvovirus, en zou de mogelijkheid hebben om HIV en HBV te vernietigen. Hoewel ethyleenoxide in het verleden zeer vaak gebruikt werd voor de sterilisatie van musculoskeletale allogreffes, hebben de meeste weefselbanken het gebruik ervan stopgezet omwille van potentiële chemische residu's in de weefsels.

Het gas **betapropiolacton** is matig antiviraal actief in humaan plasma besmet met virussen. Omdat beta-propiolacton niet kan penetreren, kan deze methode niet betrouwbaar toegepast worden om weefsels te decontamineren.

Formaldehyde gas heeft echter een slecht penetratievermogen en wordt dan ook niet toegepast als desinfectans voor weefsels.

Sterilisatie met **fysische methodes** omvat hitte, Lobator sd-2 systeem, lage temperatuur plasma sterilisatie, UV stralen/pulsen, microgolven, gamma radiatie en E-beam sterilisatie.

HIV (geënveloppeerd) heeft een lage resistentie aan **warmte** en wordt geïnactiveerd op 60°C gedurende 30 min, HBV daarentegen (complexe enveloppe) wordt geïnactiveerd na 10 uren blootstelling aan 60°C. Virussen zonder enveloppe (bv. HAV) worden zeer resistent tegen hitte geacht. Hitte denatureert proteïnen, zoals collageen, en kan weke weefsels coaguleren. Deze techniek is bijgevolg niet toepasbaar op huid en peesallogreffes. Gedemineraliseerde botmatrix (DBM) verliest zijn capaciteit tot bot- en kraakbeennieuwvorming na autoclavage.

Een nieuwe techniek is het "**Lobator sd-2 systeem**" (Duitsland) vooral gebruikt voor de processing van femurkoppen met verwarming tot 80°C. Het is een gebruiksvriendelijk systeem met bactericide en antivirale effecten. Het "Lobator sd-2 systeem" zou een veilig en effectief systeem voor de decontaminatie van allogene femurkoppen (< 60 mm diameter). Studies over het effect van deze techniek op de osteoinductieve eigenschappen van bot zijn contradictorisch.

Plasma (vierde aggregatietoestand van materie) is samengesteld uit een wolk van ionen, elektronen en neutrale species. Sterilisatie met de STERRAD® 100 sterilizer maakt gebruik van lage-temperatuur gas plasma. Het gecombineerd gebruik van plasma en H₂O₂ steriliseert producten snel zonder toxische residu's achter te laten. Deze techniek is virucide (zowel voor hydrofiele als lipofiele virussen). Er konden geen schadelijke effecten aangetoond worden op de biomechanische eigenschappen van corticale botsegmenten na sterilisatie met H₂O₂ plasma. De techniek is echter niet geschikt voor sterilisatie van gedemineraliseerde botmatrix door verlies van osteo-inductieve capaciteit.

Sterilisatie met **Ultraviolet (UV) stralen** of pulsen is niet bestudeerd voor allogreffes. Virussen zijn veel resistenter aan UV dan vegetatieve bacteriën. De combinatie UV – betapropiolacton bleek effectief voor de inactivatie van HBV, HAV, HCV en HIV. Rotavirus, Poliovirus en Coxsackie virus zijn resistenter dan HAV maar minder resistent dan Adenovirus aan UV bestraling. Intense lichtpulsen zijn een relatief nieuwe techniek om oppervlaktes/oplossingen te decontamineren. Deze methode is effectief tegen alle micro-organismen, inclusief virussen. De aanwezigheid van proteïnen in het substraat en virusaggregatie inhibeert virusinactivatie. Men weet niet of er centrale penetratie is van UV in massieve botallogreffes, bovendien zijn er collageenwijzigingen in botten en pezen behandeld met UV en verliest gedemineraliseerde botmatrix zijn osteo-inductiviteit na blootstelling aan UV.

Een zeldzame toepassing met sterilisatie van gecontamineerde femurkopfragmenten via **microgolven** werd in de literatuur beschreven. Virussen worden geïnactiveerd binnen de drie minuten na microgolfbehandeling (2,45 GHz). De biomechanische eigenschappen van bot worden echter aangetast na behandeling met microgolven.

Gamma-irradiatie (een pakket van elektromagnetische energie – een foton) heeft een hoge penetratie capaciteit (incl. humane weefsels). Gammabestraling (Co⁶⁰-bron) is zeer effectief tegen bacteriën bij doses van 15 tot 25 kGy. Voor de inactivatie van de meeste virussen is minstens 30 kGy nodig. Deze dosis ligt aan de hoge range en overstijgt soms de routine aanbevolen dosis voor sterilisatie van botgreffes (10-35 kGy). Gammastralen kunnen tot 30 cm diep penetreren in water (densiteit: 1 g/cm³). Dit betekent dat huid, amnion, pericard en pezen kunnen met deze techniek gesteriliseerd worden. Als de gemiddelde densiteit van een greffe groter is, zoals voor een botgreffe bv. (2 g/cm³), is de aanvaardbare dikte van een corticale botgreffe blootgesteld aan gammastralen ongeveer 10-15 cm. Afhankelijk van de fysische toestand van de botallogreffes (temperatuur, gelyofiliseerd, diepgevrozen) verschilt de dosis waarbij er schade aan de biomechanische eigenschappen van het bot optreden. Er kan gebruik gemaakt worden van protectieve agentia zoals propyleenglycol om de biomechanische eigenschappen van bot te vrijwaren tijdens bestraling. De effecten van bestraling op pezen en gedemineraliseerde botmatrix zijn contradictorisch. Gammabestraling van bot en weke weefsels zou de collageenstructuur veranderen, de tensiele sterkte reduceren, en bone morphogenetic proteins inactiveren. Cornea

en hartkleppen kunnen niet bestraald worden voor sterilisatie. Ook voor huid is bestraling niet de ideale sterilisatie techniek, dit leidt tot stijfheid van de huid en minder adherentie en dus lagere take-rate van de donorhuid. Elektronen van een **E-beam straler** kunnen tot 8 cm diep penetreren in water (densiteit: 1 g/cm³). Met een gemiddelde densiteit van een botgreffe groter dan 2 g/cm³, is de aanvaardbare dikte van een corticale botgreffe blootgesteld aan electronenbeam stralen 3 cm. Er is geen cytotoxiciteit op botten behandeld met de elektronen beam stralen. Gammastralen daarentegen zijn (bij kamertemperatuur) toxisch voor osteoblast-like en fibroblast-like cellen.

Grieb *et al* bestudeerden de biomechanische en **antivirale effecten** van **50 kGy** na een protectieve behandeling van spongieuze botfragmenten met propyleen-glycol, dimethyl sulfoxide, mannitol, trehalose gedurende 4 u onder sonicatie. Met deze protectieve behandeling waren de biomechanische eigenschappen (elasticiteitsmodulus en compressie sterkte) niet verschillend tov deze van controle onbestraalde botten. Varkens parvovirus als modelvirus voor parvovirus B19 en HAV werden geïnactiveerd met 5 log₁₀. Sindbis virus als surrogaat voor HIV en HCV werd met 4.9 log₁₀ gereduceerd. Pruss *et al* bestudeerden de virale inactivatie van viraal gecontamineerde botfragmenten. Het meest resistente virus was runder parvovirus als surrogaat voor parvovirus B19. Een dosis van 34 kGy (bij -30±5°C) was vereist om een 4-log₁₀ reductie te bekomen. Runder diarreevirus als surrogaat voor HCV bleek in deze studie het meest gevoelig te zijn aan bestraling en werd geïnactiveerd met ≥ 6,5 log₁₀ bij 34 kGy. Pruss *et al* bevelen aan om een dosis van 34 kGy te gebruiken voor de sterilisatie van botallogreffes. Deze aanbeveling geldt enkel bij temperaturen van -30°C, omdat virale infectiviteit geassocieerd is met de temperatuur tijdens de bestraling.

Verschillende **preservatietechnieken** kunnen toegepast worden op de verschillende types allogreffes: vriezen, cryopreservatie, vriesdrogen, en glycerolisatie.

Invriezen is een sinds lang gebruikte methode voor de bewaring van bot en collageen weefsel als enige preservatiemethode of alvorens te vriesdrogen. De aanbevolen vriestemperatuur voor langdurige bewaring (tot 5 jaar) van botten, pezen of kraakbeenallogreffes is minder dan -40°C. Invriezen reduceert de mechanische eigenschappen van ligamenten niet, maar heeft ook geen steriliserend effect. Invriezen reduceert misschien de virale load van HIV volgens enkele studies, maar HIV kan niet geïnactiveerd worden door invriezen.

Cryopreservatie dient volgens een gevalideerde methode te verlopen (onmiddellijk invriezen of volgens een gecontroleerde invriestechiek). Voor huidallogreffes wordt deze techniek gebruikt in combinatie met glycerol als cryoprotectans, voor kraakbeen en chondrocyten met dimethylsulfoxide. De histologische veranderingen bij deze preservatietechniek zijn zonder effect voor de mechanische eigenschappen van het weefsel. Deze techniek is niet antiviraal actief, integendeel wordt ze ook gebruikt om microorganismen te bewaren.

Vriesdrogen of lyofiliseren is een populaire methode om botallogreffes, maar ook collageen weefsel inclusief ligamenten, langdurig te bewaren op kamertemperatuur. Vriesdrogen is echter nadelig voor de mechanische stabiliteit en incorporatie van botgreffes, wat deze techniek minder geschikt maakt voor grote botgreffen en pezen. Vriesdrogen tast de osteoinductieve capaciteit van botweefsel niet aan. Lyofilisatie volstaat niet als virale inactiveringsmethode voor musculoskeletale allogreffes, aangezien residuele infectiviteit aangetoond kon worden in experimentele modellen voor virussen met of zonder enveloppe.

Tot slot is er glycerol, dat in hoge concentraties werkt als een chemisch lyofiliserend middel. **Glycerol** zou de structuur van weefsels en cellen bewaren en de antigeniciteit van het weefsel reduceren. Glycerol heeft beperkte en zeer traag werkende antimicrobiële en antivirale effecten. Cameron *et al* toonden in 2000 aan dat HIV-1 (celvrij en huid geassocieerd) binnen de 8 uren kan geïnactiveerd worden. Het gebruik van glycerol als preservatiemiddel werd beschreven voor huid, dura mater, hartkleppen, vasculaire greffes, cornea's, ribkraakbeen, en botten.

	Demineralized bone matrix	Botallogreffen	Pezen	Cornea	Huid	Hartkleppen	Gehoorbeentjes	Dura mater
Mechanische reiniging		Gedoseerde pulslavage kan partieel decontamineren, geen terminale sterilisatie	Niet bestand tegen hoge druklavage, gedoseerde pulslavage te valideren					
Chemische behandeling								
Peroxiden		*H ₂ O ₂ : Max 1u behandeling met H ₂ O ₂ om reductie in osteoinductiviteit te vermijden, antiviraal effect onvoldoende bestudeerd	Mogelijk grotere collagenase gevoeligheid met Perazijnzuur 0,1% gedurende 3u, geen studies over antiviraal effect op gecontamineerde pezen	H ₂ O ₂ = toxisch	0,1% <u>perazijnzuur</u> geeft geen histologische schade zo in combinatie met glycerol of propyleenglycol, antiviraal effect onvoldoende bestudeerd	<u>Perazijnzuur</u> : met 0,21 % behoud van mechanische eigenschappen en 2-log reductie van virussen (HSV-I en polio I)		
		* <u>Perazijnzuur</u> : beperkte penetratie in bot, 1 % Perazijnzuur in ethanol 24 % gedurende 4u geeft goede virusreductie in botblokjes.						
		<u>Chloroform</u> : methanol bevordert penetratiecapaciteit						
Chlorhexidine		Toxiciteit van 2 % chlorhexidine gluconaat op gewrichten waterige oplossingen hebben geen activiteit op niet-geënveloppeerde virussen						

	Demineralized bone matrix	Botallogreffen	Pezen	Cornea	Huid	Hartkleppen	Gehoerbeentjes	Dura mater
Chloorderivaten: Chloordioxide						10 min incubatie in chloordioxide → 3-log reductie van HSV-I en polio I in myocardfragmenten		
Alkylerende agentia: formaldehyde							Inactivatie HIV gecontamineerde gehoorbeentjes met 4 % formaldehyde + cialit	5-log reductie gelyofiliseerde dura mater met 0,05 % formaldehyde
Glutaraldehyde						Hoewel antiviraal actief, snelle klepdegeneratie, geen humane toepassing in weefselinstellingen		
Organische kwikantiseptica							Onvoldoende antiviraal effect en toxisch. Historisch gebruikt voor bewaring gehoorbeentjes	
Alcoholen ethanol	Ethanol 50 %: Onderdeel van de procedure tot bereiding, geen nadelig effect op osteo-inductiviteit, variabel antiviraal effect	Cytotoxisch voor osteoblasten, ongekende penetratiecapaciteit in bot, partieel inactiverend als deel van verwerkingsprocedures	Ethanol 70 % penetreert pezen: na 3 u 20% ethanol in diepe peesdelen (actief op HIV-I)	Ethanol 70 %: Preservatiemiddel voor sclera (geen in-vitro studies antiviraal effect)			Ethanol 70 %: preservatie gehoorbeentjes (geen in-vitro studies antiviraal effect)	
Alcoholen: methanol	Onderdeel van reinigingsproces botten, ook antiviraal actief							

	Demineralized bone matrix	Botallogreffen	Pezen	Cornea	Huid	Hartkleppen	Gehoerbeentjes	Dura mater
Iodium-iodoforen		Toxich effect van polyvinyl-pyrrolidon, geen in-vitro antivirale studies		Ontsmetting cornea, geen in-vitro antivirale studies				
Oppervlaktespanningssverlagende middelen	Mogelijk onderdeel van reinigingsproces botten, ook antiviraal actief							
Superkritische CO ₂		4 tot 6-log reductie viraal geïnfecteerde femurkopfragmenten, veilige techniek, schaarse literatuur						
Sterilisatie door middel van gas								
Ethyleenoxide	Effectieve sterilisatie, geen inactivatie van osteo-inductiviteit, toxische residuen leiden tot onbruik	Historisch gebruik, nadelig voor biomechanische eigenschappen bot, toxische residuen met mogelijk inflammatoire respons, echter goede antivirale werking	Cfr botallogreffen					
Betapropiolacton		Historisch gebruik, toxisch en onvoldoende penetratievermogen				Historisch gebruik, Klepdegeneratie en ruptuur, onvoldoende penetratievermogen		
Fysische sterilisatiemethodes								
hitte	Denaturatie proteïnen → onbruikbare techniek	Destructie osteo-inductieve eigenschappen → onbruikbare techniek	Denaturatie collageen → onbruikbare techniek		Coagulatie weefsels → onbruikbare techniek			
	Demineralized	Botallogreffen	Pezen	Cornea	Huid	Hartkleppen	Gehoerbeentjes	Dura mater

bone matrix					
Lobator systeem: 80°C – 15 min	Sd-2	4-log bestudeerde in femurkopfragmenten, onduidelijk effect op osteo-inductiviteit, beperkte penetratiecapaciteit	reductie virussen in		
Lage temperatuur plasma sterilisatie	Goed effect, effect op osteo-inductiviteit (beperkte data)	Goed effect, schadelijk effect op biomechanische eigenschappen (beperkte data)	antiviraal effect		
UV stralen	Verlies van osteo-inductiviteit, geen in-vitro studies	Ongekende penetratiecapaciteit, geen in-vitro studies	antiviraal effect		
Microgolven		3 min bestraling 2,45 GHz	antiviraal actief, nadelige effecten op botweefsel onvoldoende bestudeerd (1 enkele studie)		
Gamma-irradiatie/E-beam sterilisatie	Wisselende effecten op de osteo-inductieve eigenschappen van bot, afhankelijk van de stralingscondities	Wisselende effecten op de biomechanische eigenschappen van bot, afhankelijk van de stralingscondities	Wisselende effecten op de mechanische eigenschappen van de pezen, afhankelijk van de stralingscondities	Structurele schade door gammastraling, stijfheid van de huid	Structurele schade door gammastraling

Algemeen beschouwd (hfdst 8: slotbeschouwingen), is het moeilijk om de efficaciteit van virale inactivatieprocedures op weefsels te evalueren. Vaak is de vraag of er voldoende penetratiecapaciteit is van de behandeling, en wat de schadelijke effecten ervan zijn op de weefselstructuur. Virale transmissie kan best vermeden worden door een zorgvuldige screening van de potentiële weefsel/celdonor, verwerking van de weefsels met geschikte methoden (mechanische reiniging, spoelen) die leiden tot een reductie van het infectierisico, naast **serologie en NAT testen**.

Hoewel er reeds enorme vooruitgang geboekt werd in de detectietechnieken van virussen in serum/plasma, blijven vals-positieve resultaten (probleem van specificiteit) mogelijk. Dit reduceert het donorpotentieel. De oorzaken van vals-positieve resultaten zijn onder andere hemolyse en aanwezigheid van inhiberende substanties in *postmortem* bloed. Ook vals negatieve resultaten kunnen voorkomen, dewelke veel ernstiger zijn voor de veiligheid van de greffe aangezien dit de mogelijkheid van overdracht van een virale infectie op de receptor met zich meebrengt. Daarom is een excellente sensitiviteit van serologische of NAT screeningstesten van essentieel belang (cfr. FDA website met assays gevalideerd voor levende en kadaverdonoren (dwz postmortem bloed)).

Bij **overleden** donoren worden minimaal anti-HIV 1-2 As, HBs Ag, HBc As, anti-HCV As uitgevoerd met, tenzij er een inactiveringsstap voor de betrokken virussen gebruikt wordt, ook een HIV-1, HBV en HCV NAT test.

Indien bij een **levende** donor (met uitzondering van donoren van geslachtscellen, stamcellen en perifeer bloed) HIV, HBV en HCV NAT testen worden uitgevoerd, kan een tweede serologisch onderzoek komen te vervallen, dat normaliter 180 dagen na de donatie uitgevoerd wordt. Deze herhalingstesten vervallen eveneens wanneer een gevalideerde inactiveringsstap voor de betrokken virussen gebruikt wordt bij de weefselverwerking.