

# Die Virussicherheit von Blutprodukten: Aspekte der behördlichen Anforderungen

Virus safety of blood products: aspects of official requirements

H. Rabenau<sup>1</sup>

## Zusammenfassung

Pharmazeutika, die aus humanem Ausgangsmaterial stammen (speziell Blut- und Plasmaprodukte), sind prinzipiell auf ein infektiöses Gefahrenpotential zu prüfen. Dies wurde in den letzten Jahren durch verschiedene Vorfälle auch in das Bewußtsein der Öffentlichkeit gebracht. Durch Blut und Blutprodukte können eine Reihe von Infektionserregern übertragen werden. Aus virologischer Sicht sind relevant: Humanes Immundefizienz Virus (HIV), Hepatitis C Virus (HCV), Hepatitis B Virus (HBV), Hepatitis A Virus (HAV), Parvovirus B19, Humanes T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV) I/II, Humanes Cytomegalievirus (HCMV) und das Epstein Barr Virus (EBV). Diese Viren weisen sehr unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften auf, was auf ihre Inaktivierbarkeit einen erheblichen Einfluß hat.

Der Gefahrenausschluß hängt in hohem Maße davon ab, inwieweit die Produktionsverfahren in der Lage sind, potentiell vorhandene Viren zu eliminieren oder zu inaktivieren. Daneben sollen die sorgfältige Spenderauswahl und das Screening gespendeter Blut-Einheiten auf bekannte infektiöse Agentien die Sicherheit eines pharmazeutischen Produktes gewährleisten.

Entsprechende Forderungen und Regelungen sind durch die Europäische Union bereits vor Jahren herausgegeben und im letzten Jahr durch bundesdeutsche Behörden auf nationaler Ebene in einigen Punkten ergänzt bzw. weitergehend präzisiert worden. Darin wird u. a. gefordert, in sogenannten Validierungsstudien eine quantitative Abschätzung der Gesamtvirusabreicherung bzw. -inaktivierung im Verlaufe von mehrstufigen Reinigungs- und Inaktivierungsverfahren bei der Herstellung solcher Produkte durchzuführen. Unter Einbeziehung biometrischer Analysen und durch die Forderung nach Kombination mehrerer zur Inaktivierung/ Eliminierung von Viren geeigneter Verfahrensschritte ist sicherzustellen, daß insgesamt eine Reduktion der Infektiosität um

mindestens Faktor  $10^{10}$  für umhüllte Viren bzw.  $10^6$  für nicht-umhüllte Viren im Modellsystem gewährleistet und damit in praxi die Virussicherheit von Blutprodukten sichergestellt ist.

## Schlüsselwörter

Blut- und Plasmaprodukte – Virussicherheit – behördliche Anforderungen

## Summary

Pharmaceuticals produced from human material (especially blood and plasma products) need to be investigated for their potential to transmit infections. Even the public was made aware of this fact in recent years by several incidents. Blood and blood products can transmit a number of infectious agents. From a virological point of view, the following are relevant: human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis C virus (HCV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis A virus (HAV), parvovirus B19, human T-lymphotropic viruses (HTLV) I and II, human cytomegalovirus (CMV), and Epstein Barr virus (EBV). These viruses have widely different physico-chemical properties that influence their susceptibility to inactivation.

The exclusion of risks depends largely on how far the manufacturing steps applied are able to eliminate or inactivate viruses that are potentially present. Also, careful choice of donors as well as the screening of donated blood units for known infectious agents can help to safeguard the safety of pharmaceutical products.

Relevant requirements and rules have been issued by the European Union already years ago. These regulations were supplemented or further specified by German Federal authorities on a national level last year. Amongst other requirements, a quantitative estimate of total virus reduction and inactivation in the course of multi-step purification and inactivation procedures has to be conducted by means of so-called validation studies in the manufacturing process of such products. Including biometrical analyses and the requirement to combine several production steps suitable for inactivation and elimination of viruses, it has to be guaran-

<sup>1</sup> Korrespondenzadresse: Dr. H. Rabenau, Institut für Medizinische Virologie im Universitätsklinikum Frankfurt/Main, Paul-Ehrlich-Str. 40, D-60596 Frankfurt am Main, Fax: x-49-69-6301-6477

ted that a total reduction of infectiosity of at least  $10^{10}$  for enveloped and  $10^6$  for non-enveloped viruses is achieved in the model system. These requirements should help to ensure the virus safety of blood products in practice.

### Key words

blood- and plasma products – virus-safety – official requirements

### Einleitung

Es wird geschätzt, daß etwa 70 % der Bundesdeutschen mindestens einmal im Leben ein Medikament erhalten, das aus menschlichem Blut oder Plasma hergestellt wird bzw. solche Komponenten beinhaltet. Produkte, die aus humanem Ausgangsmaterial stammen und zu Pharmazeutika weiterverarbeitet werden, seien es Präparate zur Therapie bei gestörter Blutgerinnung (z. B. Faktor VIII), PPSB (Prothrombin + Prokonvertin + Stuart-Prower-Faktor + antihämophiler Faktor B) oder gefrorenes Frischplasma, sind prinzipiell nicht ohne jegliches Gefahrenpotential, was die Übertragbarkeit von Infektionserregern betrifft [1, 2].

Für die Hersteller solcher Pharmazeutika ergibt sich daraus die Verpflichtung, die Sicherheit dieser Medikamente durch geeignete Maßnahmen so optimal wie möglich zu gestalten. Entsprechende Forderungen und Regelungen sind durch die Europäische Union (EU) [3, 4] bereits vor Jahren herausgegeben und im letzten Jahr durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI), dem Bundesamt für Sera und Impfstoffe, als zuständige Bundesbehörde, auf nationaler Ebene in einigen Punkten ergänzt bzw. weitergehend präzisiert worden [5, 6].

„Vor Erteilung einer Genehmigung für das Inverkehrbringen eines aus menschlichem Blut oder Blutplasma bestehenden Arzneimittels muß der Hersteller nachweisen, daß er in der Lage ist, permanent zu gewährleisten, daß die Fabrikationsansätze übereinstimmen und daß – soweit dies aufgrund des Stands der Technik möglich ist – keine spezifischen Viren vorhanden sind“. (aus der Richtlinie des Rates zur Angleichung der Richtlinien der verschiedenen EU-Vorschriften).

### Quellen der Risiken

Blut und Blutprodukte können prinzipiell eine Reihe verschiedener infektiöser Erkrankungen übertragen. Als relevant sind solche Viren zu bezeichnen, die im Blut auftreten und damit beispielsweise mit einer Blutspende übertragbar sind. Hierzu zählen das Humane Immundefizienz Virus (HIV), das Hepatitis C Virus (HCV), das Hepatitis B Virus (HBV), das Hepatitis A Virus (HAV) und Parvovirus B19, sowie HTLV I/II, Cytomegalievirus (CMV) und das Epstein Barr Virus (EBV) (Tabelle 1).

Das Risiko sich eine Infektion mit diesen Erregern über Blut- oder Blutprodukte zuzuziehen wurde verschiedentlich kalkuliert. In solche Risiko-Betrachtungen fließen u. a. Daten zur Präsenz der Erreger in der Bevölkerung ein (so tritt HTLV I/II im europäischen Raum kaum auf) sowie die Dauer, in der Viren im Blut nachweisbar sind (sie kann z. T. sehr kurz sein, wie im Fall von HAV oder Parvovirus B19). Ferner ist die Höhe der Virämie, die z. T. sehr schwanken kann, einflußnehmend (Tabelle 2) sowie die Stabilität der Viren und der Manifestationsindex, d. h. die Häufigkeit, mit der der Kontakt mit einem Erreger zu einer Erkrankung führt. Daneben ist natürlich ausschlaggebend, ob Viren zellfrei oder (überwiegend) zellgebunden auftreten, wie im Fall von HTLV I/II, EBV und CMV, so daß diese für zellfreie Produkte im Regelfall ohne erhöhtes Risiko sind.

**Tabelle 1.** Durch Blut- und Plasmaprodukte übertragbare Viren: Seroprävalenz und Infektionsrisiko

Virus	Übertragbarkeit		Prävalenz (in %)	Infektionsrisiko*	assoziierte Erkrankungen
	Blut	Plasma			
HIV 1/2	+	+	0,05 – 0,1	$1:5 \times 10^5 - 1:10^6$	AIDS
HBV	+	+	4 – 6	$1:2 \times 10^4 - 1:4 \times 10^4$	(chron.) Hepatitis, Zirrhose
HDV	+	+	< 0,02		(chron.) Hepatitis, Zirrhose
HCV	+	+	0,2 – 0,4	$1:2 \times 10^4 - 1:4 \times 10^4$	(chron.) Hepatitis, Zirrhose
Parvovirus B19	+	+	15 – 30		Erythema infectiosum, hämolytische Anämie
HAV	+	+	> 40		Hepatitis
HTLV I/II	+	-	< 0,001		Leukämien u. maligne Erkrank.
CMV	+	-	50	< $1:10^9$	Hepatitis, Ikterus, interstiitielle Pneumonie
EBV	+	-	> 80		Mononukleose, lymphoproliferative Erkrankungen

\* Infektionsrisiko durch Blut- und Plasmaprodukte

**Tabelle 2.** Infektionstiter einiger humanpathogener, virämisch auftretender Viren

Virus	max. (Virämie)titer	Literatur
HAV	10 <sup>5</sup> ID/ml Serum	[7]
HBV	10 <sup>5</sup> – 10 <sup>9</sup> Virionen/ml Serum	[8]
	10 <sup>8</sup> ID/ml	[9]
HCV	2 × 10 <sup>3</sup> – 1 × 10 <sup>8</sup> RNA Genome/ml Serum	[10]
	10 <sup>5</sup> RNA units/ml Serum,	[11]
HIV	≤ 1,1 × 10 <sup>7</sup> HIV-Virionen/ml Plasma	[12]
	≤ 4,5 × 10 <sup>4</sup> RNA Copies/ml Plasma	[13]
	– bei asymptomat. Pat. im Mittel	
Parvo-virus	1,8 × 10 <sup>3</sup> RNA Copies/ml	[14]
	10 <sup>11</sup> Partikel/ml Serum	
	2,4 × 10 <sup>4</sup> – 5 × 10 <sup>10</sup> Copies viraler DNA/ml Plasma,	[15]

Für Blut- und Blutprodukte wird das Infektionsrisiko für HCV und HBV mit ca. 1 : 20.000 – 1 : 40.000 und für HIV mit 1 : 500.000 – 3.000.000 angegeben [16]. In Nachbarländern wird in Bezug auf HIV das Risiko unterschiedlich bewertet: England und Skandinavien 1 : 1.000.000, Frankreich 1:200.000 und Spanien, Italien, USA 1 : 100.000. In Thailand steigt dieses Risiko auf 1 : 10.000 und in Zentral-Afrika sogar auf 1 : 1.000 [17].

Virämisch auftretende Viren weisen z. T. sehr unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften auf, was insbesondere in Bezug auf ihre Inaktivierbarkeit einen erheblichen Einfluß hat (Tabelle 3). So z. B. sind HIV-Viren behüllte RNA-Viren mit einem Durchmesser von ca. 100 nm. Sie sind recht labil und durch ihre lipoproteinhaltige Hülle relativ leicht zu inaktivieren. Demgegenüber ist das Hepatitis A Virus ein kleines – 27 nm großes – RNA Virus ohne Hülle und ziemlich stabil. Von besonderer Stabilität ist auch das zur Familie der Hepadnaviridae zählende 42 nm große HBV.

Für lange Zeit war das Hauptrisiko bei der Verwendung von Blutprodukten die virale Hepatitis, insbesondere die Hepatitis B und die transfusionsassoziierte non-A-non-B (NANB)-Hepatitis, deren ätiologischer Faktor inzwischen als das Hepatitis C Virus identifiziert werden konnte. 90 % der NANB-Hepatitis werden durch HCV verursacht.

Hämophile, die bereits vor 1980 entsprechende – damals nicht virusinaktivierte – Gerinnungspräparate erhalten hatten, sind zu einem erheblichen Anteil HBV und HCV infiziert. So betrug die Durchseuchung mit HBV nahezu 100 % und die mit NANB-Hepatitis > 80 % [18, 19, 20].

Die HIV-Prävalenz bei Hämophiliepatienten schwankt zwischen verschiedenen Ländern und wird mit 5 % bis mehr als 50 % angegeben [20, 21, 22]. In der BRD wurden ca. 30 % der Hämophilen durch die Applikation kontaminierter Gerinnungspräparate Opfer einer HIV-Infektion. 1993 waren insgesamt 1332 Hämophile infiziert, davon verstarben bereits 396 (hiervon wieder 70 % an AIDS).

Der Einsatz von Blut und Blutprodukten ist national und international mit einer Reihe von Skandalen und Unfällen assoziiert (Tabelle 4), so 1990 der „PPSB-Unfall“ oder 1993 der Fall der Firma UB-Plasma. Zwei der ca. 5000 Stammspender dieser Firma waren, während sie in regelmäßigen Abständen Plasma spendeten, HIV-infiziert worden. Durch ein unzulässiges Poolen von Seren (zur Kostenersparnis) vor der Prüfung auf HIV-spezifische Antikörper kam es zu einem Verdünnungseffekt, daraus folgend zu einer reduzierten Nachweiswahrscheinlichkeit.

**Tabelle 4.** Bekannte Fälle von Virusübertragungen in der BRD durch Blutprodukte (nach 1985)

Zeit	Quelle	Virus	Anzahl Fälle	Verfahren*
1990	PPSB	HIV	11	β-Propiolaktol/UV
1991	Faktor VIII	HAV	>80**	S/D
1993/1994	i.v. Immunglobuline***	HCV	>30	Cohnfraktionierung
1994	PPSB	HBV	>30	Pasteurisierung (60° C, 10 h)

\* Bei der Aufreinigung bzw. Herstellung der pharmazeutischen Produkte verwendetes Verfahren

\*\* Übertragungsfälle traten in Belgien, Irland, Deutschland und Italien auf

\*\*\* Gammagard (weltweit mindestens 200 Fälle) S/D Solvent / Detergent-Verfahren

**Tabelle 3.** Stabilität von virämisch auftretenden humanpathogene Viren (im Einzelfall sind in der Stabilität erheblich abweichende Stammvarianten zu berücksichtigen).

Vertreter	Familie	Genom	Außenstruktur	Größe	Stabilität
CMV, EBV	Herpesviridae	dsDNA	mit Hülle	120 – 200 nm	++
HBV	Hepadnaviridae	dsDNA	mit Hülle	42 nm	+++
HDV	Deltavirus (Genus)	zirkuläre RNA	mit Hülle	34 nm	+++
Parvovirus B19	Parvoviridae	ssDNA	ohne Hülle	18 – 26 nm	++++
HAV	Picornaviridae	ssRNA	ohne Hülle	22 – 30 nm	+++
HCV	Flaviviridae	ssRNA	mit Hülle	40 – 50 nm	++
HIV-1 / HIV-2	Retroviridae	ssRNA*	mit Hülle	80 – 100 nm	+
HTLV I/II	Retroviridae	ssRNA*	mit Hülle	80 – 100 nm	+

ss = einzelsträngiges Genom; ds = doppelsträngiges Genom; \*positiver Einzelstrang, DNA-Schritt in der Replikation

lichkeit und in der Schlußkonsequenz zu 3 HIV-Übertragungen auf Rezipienten [23].

Insgesamt sind Blutprodukte in den letzten Jahren jedoch wesentlich sicherer geworden. Grundsätzlich ist das potentielle Infektionsrisiko zu differenzieren u. a. nach der Art des Blutproduktes bzw. der Möglichkeit dieses einem Virusinaktivierungsverfahren zu unterziehen.

1. Zu den nicht inaktivierbaren Blutprodukten zählen die korpuskulären Konzentrate, die auf Grund der Fragilität der Zellen nicht durch physikalische oder chemische Verfahren weniger infektiös gemacht werden können. Hierzu zählen u. a. Vollblut, Erythrozytenkonzentrate, Tiefkühl-Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate, Leukozytenkonzentrate und Humanserum.
2. Als risikofrei bzw. mit einem sehr geringen Risiko assoziiert werden auf Grund des Herstellungsverfahrens Präparate wie Albumin-Lösung, Plasmaproteinlösungen und Immunglobuline (zumindestens für HIV). Diese werden aus Plasmapools hergestellt und unterliegen einer Reihe von Inaktivierungsverfahren.
3. Die dritte Gruppe, ebenfalls aus Plasmapools, sind solche Produkte, bei denen verschiedene Inaktivierungsverfahren zum Einsatz kommen. Hierzu zählen u. a. die Gerinnungspräparate. Bei ihnen schränkt der Wunsch nach Erhalt der Enzymaktivität die Aggressivität der virusinaktivierenden Maßnahmen ein. Doch wurden auch hier entscheidende Fortschritte erzielt. Während die Generation von Faktor VIII-Präparaten, bei denen HIV-Übertragungen nachgewiesen wurden, beim Herstellungsprozeß vom Ausgangsplasma zum Endprodukt eine 25–100-fache Aufreinigung erfuhren (bei gleichzeitigem Risiko auch eventuell vorhandene Viren aufzukonzentrieren), werden heutige Präparationen mit einem 10.000-fachen Aufreinigungsgrad hergestellt. Dabei findet eine Aufkonzentrierung eventueller Viren nur um den Faktor 30–100 statt.

## Risikominimierung

Um Risiken durch virale Kontaminationen in Blutprodukten zu reduzieren bzw. zu minimieren erfolgen Vorsorgemaßnahmen auf verschiedenen Ebenen:

1. sorgfältige Auswahl der Spender,
2. Screening gespendeter Einheiten auf bekannte infektiöse Agentien, und
3. Einsatz von spezifischen Schritten zur Abreicherung bzw. Inaktivierung von Viren.

Bei jeder Blutspende werden die Spender körperlich untersucht sowie Interviews zu potentiellen Risiken des Spenders durchgeführt. Dabei ist erwähnenswert, daß nach einer Studie von Peterson et al. [24] nur 4 % der Personen mit AIDS keinen spezifischen Risikofaktor angeben konnten, was die Zweckmäßigkeit dieser Interviews unterstreicht. Auf der anderen Seite konnten 25 % der männlichen und 40 % der weiblichen Blutspender, die

anläßlich ihrer Spende als HIV-positiv identifiziert wurden, kein spezifisches Risiko angeben [25].

Ferner werden alle Blutspenden auf verschiedene virologische Parameter gescreent, mit dem Ziel virusinfizierte Spenden auszuschließen bzw. die maximal vorhandene Virusbelastung in einem späteren Plasmapool zu minimieren. So wird seit 1975 jede Spende auf Hepatitis B-Oberflächenantigene (HBsAg) getestet, seit 1985 zusätzlich auf HIV-spezifische Antikörper (anti-HIV) und seit 1990 auch auf anti-HCV (Immunglobuline dürfen seit dem 1. 1. 1993 nur noch aus anti-HCV negativen Plasmen hergestellt werden). Bereits seit 1965 werden alle Spenden auf erhöhte Transaminasen geprüft.

Die Sicherheit, die von diesen Screeningtests ausgehen kann, ist allerdings nur so gut, wie ihre Sensitivität und Spezifität und natürlich der Möglichkeit, auch frühe Infektionen zu erfassen. Die Bildung viruspezifischer Antikörper erfolgt bekanntermaßen nicht unmittelbar auf die Infektion, sondern mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung, die bei HCV mit 90–120 Tagen, für HBV mit 8–45 Tagen und für HIV mit 21–45 Tagen (in über 90 % der Fälle sind spezifische Antikörper in < 150 Tagen nachweisbar [26]) angegeben wird (sogenanntes „diagnostisches Fenster“). Peterman et al. [27] kalkulierten die Sensitivität der anti-HIV-Tests im Blutspendewesen auf 96 % über die Gesamtzeit der Infektion, was bedeutet, daß auf einen unerkannten HIV-infizierten Blutspender 24 erkannte kommen [28].

Daneben können weitere Faktoren dazu führen, daß ein HIV-infizierter Blutspender nicht als solcher erkannt wird, so z. B. durch einen fehlerhaft durchgeführten Test. Hier wird das Risiko auf  $2 : 10^7$  (0,25 % Fehlerhäufigkeit  $\times$  0,01 % Seroprävalenzrate) geschätzt. Das Risiko durch Infektionen, die zu keiner ausreichenden Immunantwort (und damit Nichtnachweisbarkeit von HIV-spezifischen Antikörpern beim Blutspender) führen, wird mit  $1 : < 10^7$  und durch antigenetische Varianz auf ebenfalls  $1 : < 10^7$  angegeben.

Auf Grund statistischer Daten kann derzeit davon ausgegangen werden, daß in der BRD von 2–2,5 Millionen Spendern ein HIV-infizierter dem Test entgeht [29].

Die geeignete Auswahl der Blutspender und Screeningverfahren sind wichtige Parameter zur Reduzierung der Virusbelastung in gepoolten Plasmaspenden. In der BRD werden jährlich ca. 4 Millionen Blutspenden gewonnen und weiterverarbeitet. Die Restmengen werden importiert. Über 90 % der deutschen Blutspenden stammen von Mehrfachspendern. Das Risiko HIV-positiver Spenden beträgt in Abhängigkeit vom Spenderkollektiv ca. 1 : 5.000 (bei Erstspendern) bzw. ca. 1 : 100.000 (bei Dauerspendern) bei einer Gesamtrate von < 2 je 100.000 (1,36–1,82 /  $10^5$  Spender [16]).

Bei bezahlten Plasmaspendern werden alle durch Blut übertragbaren Infektionen deutlich häufiger gefunden als bei unbezahlten Vollblutspendern. So spendeten mehr als 80 % der Blut- und Plasmaspendenden Drogenabhängigen bei kommerziellen Plasmasammelstellen. Dement-

sprechend ist es nicht verwunderlich, daß schon in den siebziger Jahren bei bezahlten Plasmaspendern ein 10 – 50 mal höheres Risiko für die Übertragung einer Hepatitis festgestellt wurde als bei unbezahlten Vollblutspendern [30]. Auch in Bezug auf die Übertragung von Hepatitis C wurden bei bezahlten Plasmaspendern 10,1 % Antikörper-positive gefunden im Vergleich zu 0,4 % bei freiwilligen Blutspendern [31]. In der BRD wurde für HCV eine Rate von 0,27 – 0,49 % bei Blutspendern festgestellt [16].

Für 1995 werden insgesamt ca. 2.000.000 Liter Plasma in der BRD benötigt. Da bei diesen Mengen derzeit keine ausschließliche Selbstversorgung auf nationaler Ebene erfolgen kann, wird für Plasmaderivate häufig auch Plasma aus den USA u. a. Ländern eingekauft. Für die Ausgangs-Virusbelastung eines Plasmapools sind daher u. a. auch Angaben über die jeweilige Prävalenz nach geographischen Gesichtspunkten von Bedeutung, um beim Ankauf von Plasmen aus dem Ausland gegebenenfalls eine entsprechende Risiko-Bewertung vornehmen zu können (Abb. 1).

Für HCV konnte in einer Studie gezeigt werden, daß der Anteil HCV-RNA haltiger Plasmapools bei solchen aus USA mit 52 % wesentlich höher ist als der aus Zentraleuropa (8 %) [32]. Obwohl Plasma nicht aus Entwicklungsländern eingekauft wird, ist an dieser Stelle doch zu erwähnen, daß nur 66 % der Entwicklungsländer und 46 % der unterentwickelten Länder ihre Blutspenden auf anti-HIV und nur 72 % respektive 35 % auf HBsAntigen testen [33].

### **Inaktivierung bzw. Eliminierung potentiell vorhandener Viren durch geeignete Herstellungsverfahren**

Versuche, die Sicherheit von Blut- und Plasmaprodukten zu erhöhen, basieren – wie bereits erwähnt – neben der sorgfältigen Auswahl der Spender und dem Screening der gespendeten Einheiten auf dem Einsatz von Verfahren, die spezifische Schritte beinhalten, die speziell zur Abreicherung bzw. Inaktivierung von Viren konzipiert sind (Tabelle 5).

So sollen die einzelnen Herstellungs- und Aufbereitungsverfahren nicht nur dazu beitragen, reine, biologisch aktive Pharmazeutika herzustellen, sondern auch deren Sicherheit gegenüber Infektionserregern zu gewährleisten. Diese Aufgabe erfüllen sie jedoch in unterschiedlichem Maße. Probleme können u. a. dadurch auftreten, daß Stabilisatoren, die die biologische Aktivität der gewünschten Proteine erhalten sollen, oftmals nicht nur das Produkt, sondern auch potentiell vorhandene Viren schützen und damit zu einer Art Gratwanderung zwischen Erhalt der Aktivität und Inaktivierung von Viren führen.

Die *thermische Inaktivierung in wässrigem Milieu (Pasteurisierung)* bei 60° C für 10 h. wird allgemein als sicher eingestuft. Die im letzten Jahr aufgetretenen Übertragungsfälle von HBV über PPSB waren vermutlich auf hochvirämische Spenden zurückzuführen und nicht auf eine Vielzahl niedrig-virämischer Spenden. In Patienten und Produkt wurde Übereinstimmung des (seltenen) HBV Stammes gefunden [34]. Auch wurden in Einzelfällen

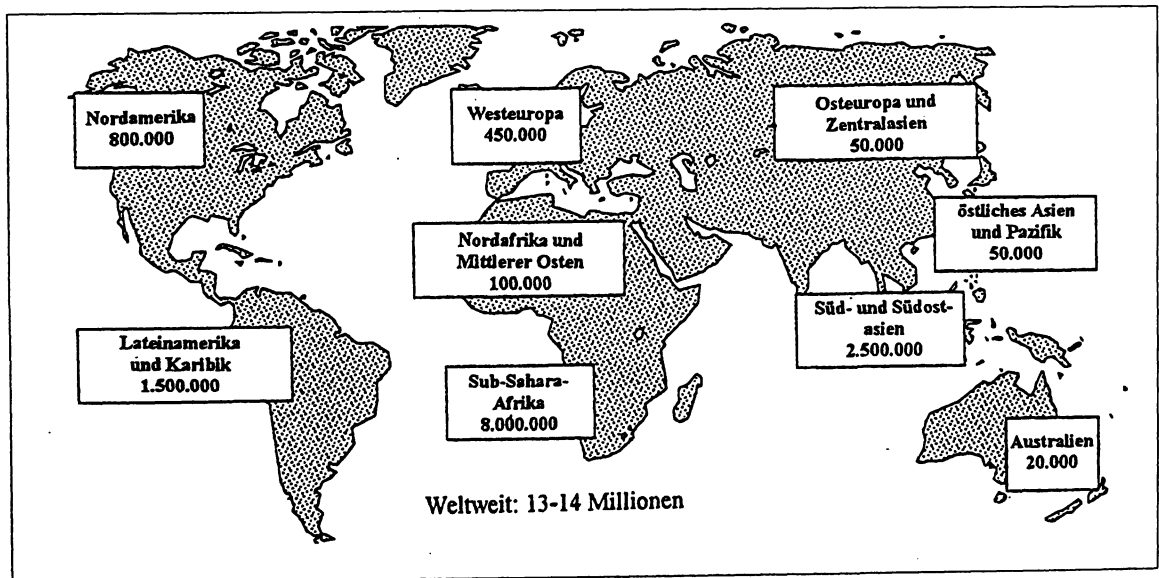


Abb. 1. Geschätzte Verteilung HIV-Infizierter Erwachsener (WHO-Daten)

**Tabelle 5.** Häufig eingesetzte Verfahren zur Inaktivierung / Eliminierung respektive zum Ausschluß von Viren bei der Herstellung von Pharmazeutika aus Blut oder Plasma

thermische Inaktivierung	- in wässrigem Milieu (Pasteurisierung) - Inaktivierung durch trockene Erhitzung - Dampfbehandlung
Kaltsterilisation mit $\beta$ -Propiolacton und gleichzeitiger UV-Bestrahlung.	
Solvent/Detergent-Behandlung z. B. TNBP/Tween 80	
Alkoholische Fällung (Cohnfraktionierung)	
Quarantänelagerung (Nachtstestung des Spenders 4 bzw. 6 Monate nach Erstspende; gegebenenfalls nachträgliche Aussonderung der Erstspende)	

HCV-Übertragungen mit pasteurisierten Gerinnungspräparaten in Verbindung gebracht [35, 36]. Demgegenüber konnte in einer Multicenterstudie keine erhöhte Gefahr für die Transmission von HAV festgestellt werden. Das statistische Risiko einer solchen Übertragung wird für pasteurisierte Faktor VIII-Konzentrate mit 0–3 % angegeben [37].

Die Inaktivierung durch trockene Erhitzung ist in Abhängigkeit von der gewählten Temperatur und sonstigen Bedingungen ebenfalls relativ sicher. Anfang der 80-iger Jahre wurden bei Temperaturen von 60° bzw. 68° C für 24 respektive 72 Stunden Übertragungen von Hepatitis beschrieben. In den Jahren 1985–1987 wurden in USA zudem bei 18 Hämophilen eine HIV-Serokonversion festgestellt, die mit trocken-erhitzten Gerinnungsfaktor-Konzentraten (< 70° C) behandelt wurden [38]. Zwischenzeitlich wurde dieses Verfahren dahingehend modifiziert, daß jetzt bei 60° C für 144 Std. inkubiert wird bzw. bei 80° C für 72 Std. Bei beiden Varianten sind keine Hepatitis bzw. HIV-Infektionen mehr nachgewiesen worden.

Bei der Dampfbehandlung wird angefeuchtetes, lyophilisiertes Konzentrat heißem Dampf für 10 Stunden bei 60° C und einem Druck von 1190 mbar ausgesetzt. Diese Methode scheint ebenfalls gut geeignet zu sein.

Bei der Kaltsterilisation wird  $\beta$ -Propiolacton mit einer gleichzeitigen UV-Bestrahlung eingesetzt. Bei dieser Methode wird durch chemische bzw. photochemische „Sterilisation“ die virale Nukleinsäure zerstört [39]. Nach einer Reihe von Studien besitzt dieses Verfahren eine sehr gute virusinaktivierende Potenz, insbesondere bei Immunglobulinpräparaten [40]. Auf Grund des bereits genannten „PPSB-Unfalls“, der vermutlich auf eine besonders hohe Virusbelastung im Ausgangsmaterial zurückzuführen war, sowie entsprechende Studien, die eine ungenügende Effizienz des Verfahrens bei Anwendung an Plasma aufzeigen konnten [41], ist es für „Nicht-Immunglobulinpräparate“ weniger geeignet.

Weltweit werden ca. zwei Drittel der aus Plasma hergestellten Präparate nach dem Solvent / Detergent-Ver-

fahren behandelt [42]. Die sogenannte S/D-Behandlung (z. B. TNBP/Tween 80) besitzt hohe Wirksamkeit gegenüber behüllten Viren, wie HIV, HCV und HBV. Bei unbehüllten Viren, wie dem Hepatitis A- und Parvovirus, ist die virusinaktivierende Potenz nicht gegeben [43, 44]. Neben den in Tabelle 4 erwähnten Übertragungsfällen mit HAV [45, 46, 47, 48] wurden auch solche mit Parvovirus B19 [49] beschrieben.

Für die Herstellung von Immunglobulinen wird üblicherweise eine alkoholische Fällung, die Cohnfraktionierung, eingesetzt. Dieses Verfahren ist nach neuesten Untersuchungen gegenüber HIV wesentlich wirksamer als gegenüber HCV. Die mehr als 200 Übertragungsfälle von HCV [50] durch i. v. Applikation von Immunglobulinen („Gammagard“, Firma Baxter) führten im letzten Jahr zu erheblichen Verunsicherungen. Die bei den betroffenen Chargen verwendeten Blutspenden stammten allesamt von bezahlten, anti-HCV negativ-getesteten Spendern (aus Plasmapheresezentren in USA, Poolgröße 10.000 – 30.000 Spender).

In einer Studie konnten Ye et al [51] mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) zeigen, daß Plasmapools von HCV-negativ getesteten Spendern bis zu  $1,6 \times 10^3$  PCR-Einheiten von HCV-RNA/ml enthielten. Basierend auf Daten zur HCV-Abreicherungs-kapazität der Cohnfraktionierung gehen die Autoren davon aus, daß nicht unerhebliche Mengen von HCV-RNA in Immunglobulinen, die ausschließlich einer Cohnfraktionierung unterzogen wurden, auftreten können (10–60 PCR Einheiten der HCV-RNA/g. Immunglobulin). Dabei muß betont werden, daß ein positives PCR-Resultat keine Aussage über die Infektiosität erlaubt, sondern lediglich die Anwesenheit viralen Erbgutes anzeigt.

Auch in den betroffenen Chargen von Gammagard konnte mittels PCR HCV-spezifische RNA nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Ig-Chargen vor und nach Einführung der Richtlinie, daß für Immunglobuline nur noch Spenden von anti-HCV negativen Spendern verwendet werden dürfen, zeigte, daß bei Chargen mit anti-HCV negativen Spenden signifikant häufiger HCV-RNA nachweisbar ist [50]. Als Folge dieser und anderer, gleichlautender Studien [32] fordert das PEI nun, daß i. v. Immunglobuline, bei deren Herstellung keine wesentlichen Virusinaktivierungsschritte enthalten sind, nur noch aus im PCR-Test HCV-negativen Pools hergestellt werden dürfen.

Die Virussicherheit dieser Präparate in Bezug auf HIV ist nichtsdestotrotz gewährleistet, da zum Einen die Cohnfraktionierung selbst HIV abzureichern vermag [52] und zum Anderen zusätzliche Verfahrens-stufen, wie chromatographischen Säulen, Behandlung mit Aluminiumhydroxid und / oder Pepsin, Sterilfiltration, Polyethylenglykol-Fällungen oder pH-Absenkungen eine erhebliche Abreicherung bedingen.

Als Indikator für die z. T. eingeschränkte Kapazität der Inaktivierungs-/Eliminierungsverfahren – insbesondere gegenüber stabilen Viren wie Parvovirus B19 – sind auch

Seroprävalenzdaten zu werten, die bei Hämophiliepatienten erhoben wurden, welche einer dauerhaften Medikation mit Gerinnungspräparaten unterliegen (Tabelle 6). Bei ihnen konnten keine Unterschiede in der Seroprävalenz festgestellt werden unabhängig davon, ob sie mit virusinaktivierten oder nicht-inaktivierten Gerinnungspräparaten behandelt wurden [53]. Diese Daten wurden von Azzi et al [45] auch für Patienten, die pasteurisierte bzw. Solvent/Detergent-behandelte Faktor VIII-Präparate erhalten hatten, bestätigt. Selbst für ein Präparat, das nach einer Solvent/Detergent-Behandlung zusätzlich bei 100° C für 30 min. inkubiert wurde, konnten in 10 Fällen Parvovirus B19 Infektionen nachgewiesen werden [54].

**Tabelle 6.** Seroprävalenz von Parvovirus B19 bei Hämophilen, die mit inaktivierten Gerinnungspräparaten behandelt wurden [53]

Kollektiv	Anzahl IgG- Seropositiver
Kontrollgruppe (n = 73)	10 (14 %)
Hitzeinaktivierung und / oder S/D (n = 69)	49 (71 %)*
Nur Hitzeinaktivierung (n = 32)	20 (63 %)*
Nur S/D (n = 16)	12 (75 %)*

\* Keine Unterschiede der Prävalenz von Parvovirus B19-spezif. Antikörpern bei Hämophilen, die mit virusinaktivierten oder nicht-inaktivierten Gerinnungspräparaten behandelt wurden.

Auch für andere Parameter ergibt sich ein ähnliches Bild. Eigene Untersuchungen zum direkten Vergleich der durchschnittlichen Prävalenz von HAV, HBV und HCV zeigen bei 77 Hämophilen aus dem Universitätsklinikum Frankfurt (durchschnittliches Alter der Patienten 31,2 Jahre; Erhebungszeitraum: 8. 1991 – 4. 1993) deutlich höhere Werte als in der Normalbevölkerung [20]. Für HBV (anti-HBc) ist die Prävalenz bei Hämophilen mit 48,8 % etwa um Faktor 9 erhöht und für HCV um Faktor 220 (siehe auch Tabelle 1), während bei anti-HAV keine signifikanten Unterschiede festzustellen sind. Bei HCV zeigen Daten aus unserem Haus, daß die Seroprävalenz bei jüngeren Patienten (< 10 Jahre), die nur mit Präparaten der neueren Generation, d. h. solchen mit verbesserter Virusinaktivierung, behandelt wurden, mit < 5 % deutlich niedriger ist als bei erwachsenen Hämophilen [unveröffentlicht].

### Behördliche Anforderungen

Zur Gewährleistung der Sicherheit von Blut- und Plasma-Produkten wurden von der Europäischen Union entsprechende Richtlinien verabschiedet. Darin werden Forderungen zur Virussicherheit von Albumin, Immunglobulinen, Plasmaproteinlösungen, Gerinnungsfaktoren und anderen isolierten Plasmafraktionen gestellt [3, 4].

Wichtige Parameter sind neben der sorgfältigen Auswahl der Spender und dem Screening gespendeter Einheiten auf bekannte infektiöse Agentien der Einsatz von spezifischen Schritten zur Abreicherung bzw. Inaktivierung von Viren. Zu dem letzten Punkt wurde eine separate Richtlinie „Validation of virus removal and inactivation procedures“ im Februar 1991 veröffentlicht [3].

Da die meisten Fälle von Kontaminationen in der Vergangenheit durch Viren verursacht wurden, deren Anwesenheit nicht vorhergesehen wurde (z. B. im Polioimpfstoff eine Kontamination mit dem Affenvirus SV40 oder im Gelbfieber-Impfstoff mit dem Aviären Leukose Virus), sollen spezifische virusreduzierende Schritte im Herstellungsverfahren sicherstellen, daß auch unbekannt, unerwartete und gefährliche Viren inaktiviert und / oder eliminiert werden.

Mit der gleichen Intention und auch als Reaktion auf die verschiedenen Virusübertragungen über Blut(produkte), hat das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) mit Datum vom 11. 8. 1994, aufbauend auf dem EU-Vorschrift, bestehende Richtlinien erweitert (Tabelle 7) [6]. Deren Umsetzung sollte bis zum 31. 3. 1995 realisiert sein, andernfalls war mit Wirkung vom 1. Oktober 1995 der Widerruf der Zulassung vorgesehen. Da eine Harmonisierung mit den anderen europäischen Behörden bisher noch nicht erreicht wurde, ist mit einer erst jüngst herausgegebenen Bekanntmachung des PEI (August 1995) [55] eine entgeltliche Verbindlichkeit der genannten Richtlinie allerdings zunächst zurückgestellt worden.

Die wesentlichen Züge der PEI-Bekanntmachung [6] sollen hier dennoch vorgestellt werden. Sie präzisiert speziell die Vorgabe für sogenannte Validierungsstudien, in denen eine quantitative Abschätzung der Gesamtviruseliminierung bzw. -inaktivierung im Verlaufe von mehrstufigen Reinigungs- und Inaktivierungsverfahren bei der Herstellung solcher Produkte vorzunehmen ist (Abb. 2).

Bei solchen Versuchen werden bekannte Mengen an Viren (mindestens  $10^6$ ) den einzelnen Prozessschritten innerhalb des Herstellungsverfahrens zugesetzt und deren Eliminierung oder Inaktivierung bestimmt, sowie gegebenenfalls der kinetische Verlauf der Inaktivierung ermittelt.

Da derartige Studien nicht in den eigentlichen Produktionsanlagen durchgeführt werden dürfen und können, sind sie in verkleinerten „Pilotanlagen“, welche die organischen Bedingungen simulieren, durchzuführen. Um eine repräsentative Aussage über die entsprechende Leistungsfähigkeit des Herstellungsprozesses treffen zu können, werden verschiedene umhüllte und nicht-umhüllte DNA- und RNA-Viren exemplarisch eingesetzt – sogenannte Modellviren – die durch ihre unterschiedlichen biochemisch-physikalischen und biologischen Eigenschaften Rückschlüsse auf eine allgemeine Virussicherheit erlauben sollen (Tabelle 8).

Die Berechnung der Einzelreduktionsfaktoren erfolgt unter Berücksichtigung der Volumina in Spike (= Belastungsversuch) und Bilanzlösung. Die Gesamtvirusab-

**Tabelle 7.** Punktueller Vergleich der Richtlinien der EU [4] und des PEI [5] zur Gewährleistung der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut oder Plasma: Wesentliche Ergänzungen bzw. Erweiterungen durch das PEI

EU-Richtlinie	PEI-Forderungen/-Ergänzungen
(bietet nur einen „prinzipiellen Rahmen“)	(bietet konkrete Angaben zur Validierung)
⇒ Versuche sind in einer Pilotanlage durchzuführen (keine Angabe zur Mindestgröße im Vergleich zur Produktionsanlage)	⇒ Für Blut- und Blutprodukte sind extensive Validierungsstudien zur Gesamteliminierungs-/inaktivierungskapazität des Herstellungsverfahrens gegenüber Viren erforderlich
⇒ zu verwenden sind relevante und Modellviren (HIV ist obligatorisch)	⇒ zu prüfen ist das gesamte Verfahren in allen relevanten virusinaktivierenden Einzelschritten
⇒ Mindestinaktivierungs-/eliminationskapazität wird für Modellviren nicht angegeben, für relevante Viren wird sie beziffert mit „Die Reduktion soll größer sein, als der maximal mögliche Virustiter der potentiell im Ausgangsmaterial vorhanden sein kann.“	⇒ die Inaktivierung ist gegebenenfalls durch kinetische Studien zu belegen
⇒ Die Virusreduktion ist genau zu quantifizieren	⇒ Hinweis, daß Verkleinerung der Pilotanlage nicht willkürlich wählbar
	⇒ konkrete Angaben welche Modellviren empfehlenswert (HIV obligatorisch). Mischung Virus und Probe darf das Verhältnis 1:10 nicht überschreiten, um Änderungen der Probenzusammensetzung zu vermeiden
	⇒ Mindestreduktion des Virusgehaltes um $10^{10}$ für behüllte und $10^6$ für nicht-behüllte Viren. Es müssen mindestens zwei virusreduzierende Schritte im Herstellungsverfahren enthalten sein, die auf unterschiedlichen Wirkprinzipien beruhen.
	⇒ Konkrete methodische Vorgaben zur Bestimmung der Virusreduktion mit biostatistischer Bewertung

⇒ **Ziel**

- ♦ Prüfung des Herstellungsverfahrens auf Elimination / Inaktivierung von Viren
- ♦ Testung des gesamten Verfahrens in allen virusinaktivierenden Einzelschritten

⇒ **Voraussetzungen****Testviren**

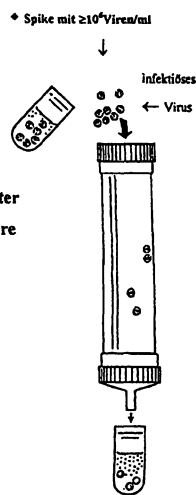
- ♦ relevante Risikoviren
- ♦ Modellviren

**Kriterien bei der Virusauswahl**

- ♦ hochtitrig in Zellkulturen anzüchtbare Viren
- ♦ zuverlässig bestimmbare Virustiter
- ♦ experimentell leicht beherrschbare Viren (geringes Sicherheitsrisiko für Personal)

**Technische Voraussetzungen**

- ♦ Labormaßstab auf Produktion übertragbar

**Prinzip****Tabelle 8.** Modellviren für Virusvalidierungsstudien zum Nachweis der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut und Plasma: Empfehlungen des Paul-Ehrlich-Institutes [5]

- ⇒ HIV (dient auch als Modell für HIV-2)
- ⇒ Modellvirus für Hepatitis C-Virus (z. B. *bovines BVDV* – umhülltes RNA-Virus, relativ thermolabil, säurelabil, basenstabil)
- ⇒ umhülltes DNA-Virus als Modell für HBV (z. B. *Herpesvirus*, *Pseudorabies* – umhülltes DNA-Virus, relativ thermolabil, empfindlich gegenüber Lipidlösungsmitteln und extremen pH-Werten)
- ⇒ nicht-umhülltes Virus (z. B. *HAV*, *Reovirus* oder *SV 40* – sehr stabiles Virus, resistent gegenüber Ether und 50%-igem Ethanol)

Auf HIV als „Test“-Virus kann wegen der enormen Konsequenz, die eine Übertragung mit sich bringt, nicht verzichtet werden. Da sich HCV und HBV nicht in Zellkulturen vermehren lassen, müssen hierfür entsprechende Modellviren eingesetzt werden.

reicherung ergibt sich dann aus der Summe der Logarithmen der Einzelreduktionsfaktoren.

Die Titerberechnung – also die Menge der bestimmten Viren – muß unter strikter Einhaltung biostatistischer Grundlagen und wahrscheinlichkeitstheoretischer Gesichtspunkte (95 % Konfidenzintervall) erfolgen. Relevant für die Genauigkeit der Titerbestimmung sind u. a. die Anzahl der Parallelansätze und die gewählten Verdünnungsstufen.

Die Erweiterung des PEIs besteht vornehmlich darin, daß während des Herstellungsprozesses insgesamt eine Titerreduktion von mindestens Faktor  $10^{10}$  für umhüllte Viren respektive  $10^6$  für nicht-umhüllte Viren gewährlei-

**Abb. 2.** Virusvalidierungsstudien: Ziele und Voraussetzungen



stet werden muß [6]. Ferner ist sicherzustellen, daß im Herstellungsprozeß zwei Schritte enthalten sind, die für „umhüllte Viren eine Titerreduktion in der Größenordnung von jeweils  $10^4$  erreichen. Für nicht-umhüllte Viren muß mindestens ein entsprechender Schritt dieser Größenordnung nachgewiesen werden.“

Nur die Kombination von mehreren zur Inaktivierung/Eliminierung von Viren geeigneten – methodisch/physikochemisch unterschiedlichen – Verfahrensschritten kann nach Ansicht des PEI eine ausreichende Sicherheit der Arzneimittel gewährleisten. So ist es nicht zulässig, zwei Hitzeinaktivierungsschritte hintereinander zuschalten und die Inaktivierungswerte zu addieren, da der Wirkmechanismus identisch ist.

Die Virussicherheit ergibt sich also – unter Berücksichtigung der maximalen Virusbelastung im Ausgangsmaterial und dem Gesamtreduktionsfaktor, d. h. daß beispielsweise bei der Verwendung von Blut, daß die maximale Virusbelastung (hochvirämischen) Phase angenommen wird (siehe auch Tabelle 2).

Die Vorgabe, daß das Herstellungsverfahren mindestens  $10^{10}$  umhüllte Viren aus einem Plasmapool abzureichern vermögen muß, ergibt sich aus folgender Überlegung [6]:

Als „ausreichend“ sicher bewertet das PEI ein Arzneimittel, wenn die theoretische Virusbelastung bezogen auf den Plasmapool weniger als 1 Viruspartikel pro 1000 Liter (=  $10^6$  ml) beträgt. Hierbei wird zugrundegelegt, daß bei entsprechender Auswahl der Spender und Screening der Einzelspenden eine Virusbelastung von max.  $< 10^4$  /ml Plasmapool für alle relevanten Viren vorliegt (Tabelle 9). Für nicht-behüllte Viren, deren Inaktivierung stets schwieriger ist, ist eine Reduzierung der erforderlichen Abreicherungsgrade nach Ansicht des PEI gerechtfertigt, da entsprechende Viren wie HAV und Parvovirus B19 in der Regel zu keinen chronischen Erkrankungen führen und die Wirkung der Viren durch neutralisierende Antikörper im Plasmapool beeinflusst wird.

## Schlußfolgerung

Die Gesamtbetrachtung der Sicherheit eines pharmazeutischen Produktes, das aus Blut gewonnen wird, setzt sich aus einer Reihe von Faktoren zusammen, wie Spenderauswahl, Screening und Abreicherungsgrad, wobei der Gefahrenausschluß in hohem Maße davon abhängt, inwieweit das Produktionsverfahren in der Lage ist, potentiell vorhandene Viren zu eliminieren oder zu inaktivieren.

Die neuen Vorschriften des PEI versuchen diese Problematik unter Einbeziehung biostatistischer Gesichtspunkte und den (z. T. leidvollen) Erfahrungen der letzten Jahre umzusetzen und u. a. durch die Forderung nach Kombination von mehreren zur Inaktivierung/Eliminierung von Viren geeigneten, unterschiedlichen Verfahrensschritten die Virussicherheit von Blutprodukten zu verbessern.

Die PEI-Forderungen stellen dabei eine sicherlich sinnvolle Erweiterung dar, die den aktuellen Stand der Wissenschaft, aber vor allem auch biostatistische Gesichtspunkte in verstärktem Maße mit einbeziehen und durch die Konkretisierung von Angaben und Vorgaben den Herstellern die Durchführung solcher Validierungsstudien erleichtert. Gleichzeitig wird genügend Spielraum für die Forschungsbereitschaft und Erkenntnisgewinne der Firmen zugelassen. Es bleibt daher zu hoffen, daß eine entsprechende Harmonisierung der Richtlinien auf EU-Ebene in Kürze realisiert wird.

Daneben zeigen die Vorgänge bei UB-Plasma, daß auch die Überwachung bestehender Vorschriften konsequenter durchgeführt werden muß, um die Sicherheit von Blut- und Plasmaprodukten zu gewährleisten.

„Risiken“ im Zusammenhang mit Medikamenten aus Blut sind beim heutigen Stand der Wissenschaft im Wesentlichen durch „menschliches Fehlverhalten“ oder technisches Versagen bedingt.

**Tabelle 9.** Virusvalidierungsstudien für Produkte aus Blut: Virusinaktivierung / Viruseliminierung - wieviel ist genug?

⇒ **Forderung des PEI für umhüllte Viren:**

- Abreicherungsgrad mindestens  $10^{10}$  bei umhüllten Viren aus einem Plasmapool

**Begründung:**

- a) theoretische Virusbelastung, bezogen auf den Plasmapool, darf maximal  $< 1$  Viruspartikel pro 1000 Liter betragen
- b) durch entsprechende Auswahl der Spender und Screening der Einzelspenden ist eine Virusbelastung von maximal  $< 10^4$  /ml Plasmapool für alle relevanten Viren zu erwarten.

⇒ **Forderung des PEI für nicht-umhüllte Viren:**

- Abreicherungsgrad von mindestens  $10^6$  bei nicht-umhüllten Viren aus einem Plasmapool

**Begründung:**

- a) nicht-umhüllte Viren sind in der Regel schwerer zu inaktivieren
- b) Infektionen führen normalerweise nicht zu chronischen Erkrankungen
- c) Wirkung der Viren durch neutralisierende Antikörper im Plasmapool beeinflusst

[ nach 6 ]

## Literatur

1. Center of Disease Control (1988) Safety of therapeutic products used for hemophilia patients. *JAMA* 260, 901-903
2. Klein RS, Friedland GH (1990) Transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by exposure to blood: Defining the risk. *Ann Intern Med* 113, 729-730
3. Committee for Proprietary Medicinal Products (EU-Richtlinien) (1991) Notes for guidance: Medicinal products derived from human blood or Plasma (III/8379/89)
4. Committee for Proprietary Medicinal Products (EU-Richtlinien) (1991) Notes for guidance on the validation of processes for the removal or inactivation of viruses (III/8115/89). *Pharmacol & Toxicol* 69, 144-148
5. Paul-Ehrlich-Institut (1994) Bekanntmachung über die Zulassung von Arzneimitteln. Anforderungen an Validierungsstudien zum Nachweis der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut oder Plasma. *BAnz* 84, 4742-4744
6. Paul-Ehrlich-Institut (1994) Bekanntmachung über Maßnahmen zur Abwehr von Arzneimittelrisiken. Verminderung des Risikos der Übertragung von hämatogenen Viren bei Arzneimitteln, die durch Fraktionierung aus Plasma humanen Ursprungs hergestellt werden. *BAnz* 161, 9244-9245
7. Cohen JI, Feinstone S, Purcell RH (1989) Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: Duration of viraemia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J Infect Dis* 160, 887-90
8. Almeida JD (1972) Individual morphological variations seen in australia antigen positive sera. *Am J Dis Child* 123, 303-309
9. Burnouf T (1992) Safety aspects in the manufacturing of plasma-derived coagulation factor concentrates. *Biologicals* 20, 91-100
10. Brillanti S, Garson JA, Tuke PW, Ring C, Briggs M, Masci C, Miglioli M, Barbara L, Tedder RS (1991) Effect of  $\alpha$ -Interferon therapy on hepatitis C viraemia in community-acquired chronic non-A, non-B hepatitis: a quantitative polymerase chain reaction study. *J Med Virol* 34, 136-141
11. Numata N, Ohori H, Hayakawa Y, Saitoh Y, Tsunoda A, Kanno A (1993) Demonstration of hepatitis C Virus genome in saliva and urine of patients with type C hepatitis: usefulness of the single round polymerase chain reaction method for detection of the HCV genome. *J Med Virol* 41, 120-128
12. Piatak M, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD (1993) High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259, 1749-1754
13. van Kerckhoven I, Fransen K, Peeters M, Beenhouwer H, Piot P, Van der Groen G (1994) Quantification of human immunodeficiency virus in plasma by RNA PCR, viral culture, and p24 antigen detection. *J Clin Microbiol* 32, 1669-1673
14. Pattison JR (1991) Human Parvoviruses. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Balows A. (ed) 5th ed, American Society for Microbiology, Washington DC, pp 924-929
15. McOmish F, Yap PL, Jordan A, Hart H, Cohen BJ, Simmonds P (1993) Detection of Parvovirus B19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31, 323-328
16. Sibrowski W, Penner M, Kühnl P (1993) Transfusionsbedingte Virusinfektionen: Wie groß ist das Restrisiko? *Inf Transf Med* 20 (2) 4-9
17. Baumgarten H, Chiewsilp P, Gilcher R, Gürtler L, Hampf H, Henrad D, Holzberger G, Jullien AM, Kühnl P, Matthes G (1993) Anmerkungen zum HIV-Antigen-Screening bei Blutspendern. *Inf Transf Med* 20 (3), 96-98
18. Fletcher ML (1983) Non-A, Non-B-Hepatitis after transfusion of factor VIII in infrequently treated patients. *Brit Med. J* 287, 1754
19. Kernoff PBA, Lee CA, Karayiannis P, Thomas HC (1985) High risk of non-A, non-B-hepatitis after first exposure to volunteer or commercial clotting factor concentrates. Effects of prophylactic immune serum globulin. *Br J Haematol* 60, 469-479
20. Weber B, Rabenau H, Berger A, Scheuermann EH, Staszewsky S, Kreuz W, Scharrer I, Schoeppe W, Doerr HW (1995) Seroprevalence of HCV, HAV, HBV, HDV, HCMV in high risk groups / Frankfurt a. M., Germany. *Zbl Bakt* 282, 102-112
21. Bone DC, Shelby MS, Dietrich L (1990) World Hemophilia AIDS Center international survey HIV infection in hemophilia. *Hemophilia World* 10, 9-14
22. Fricke W, Augustyniak L, Lawrence D, Brownstein A, Kramer A, Evatt B (1992) Human immunodeficiency virus infection due to clotting factor concentrates: results of the seroconversion surveillance project. *Transfusion* 32, 707-709
23. Simm M (1993) Rückstellproben sind inzwischen untersucht. *Deutsches Ärzteblatt* 90 (48) B-2374
24. Peterson LR, Doll LS, HIV Blood Donor Study Group (1991) Human immunodeficiency virus type 1 - infected blood donors: epidemiologic, laboratory and donation characteristics. *Transfusion* 31, 698-703
25. Doll LS, Peterson LR, White CR, Ward JW, HIV Blood Donor Study Group (1991) Human immunodeficiency virus type 1 - infected blood donors: behavioral characteristics and reasons for donations. *Transfusion* 31, 704-709
26. Kleinman S, Secord K (1988) Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by anti-HIV negative blood. Estimates using the lookback methodology. *Transfusion* 28, 499-501
27. Peterman TA, Lui KJ, Lawrence DN, Allen JR (1987) Estimating the risks of transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome and human immunodeficiency virus infection. *Transfusion* 27, 371-374
28. Caspari G, Gerlich WH (1994) HIV-p24-Antigentest im Blutspendewesen: ja oder nein? *Med Klinik* 89, 25-31
29. Caspari G, Eggers HJ, Gerlich WH (1993) Virussicherheit von Blut und Blutprodukten: Was kann verbessert werden? *Dtsch Ärztebl* 90, A1-3380-A1-3384
30. Dailey MJ (1972) Serum hepatitis and the paid blood donor. *JAMA* 221, 411
31. Dawson GJ, Lesniewski RR, Stewart JL, Bordway KM, Gutierrez RA, Pandy L, Johnson RG, Alcalde X, Rote KV, Devare SG, Robey WG, Peterson DA (1991) Detection of antibodies to hepatitis C virus in U.S. blood donors. *J Clin Microbiol* 29, 551-556
32. Nübling CM, Willkommen H, Löwer J (1995) Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet* 345, 1174

33. Gibbs WN, Corcoran P (1994) Blood safety in developing countries. *Vox Sang* 67, 377–381
34. Uy A, Grethe S, Heermann KH, Gronski P, Hilfenhaus J, Quast U, Weimer T, Zettlmeißl G, Thomssen R (1995) Virussicherheit von Plasmaprodukten, Vortrag, Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie, Gießen
35. Klarmann D, Kreuz W, Auerswald G, Auberger K, Rabenau H, Gürtler L, Roggendorf M (1995) Hepatitis C and pasteurised factor VIII and IX concentrates. *Thromb Haemost* 73, 736–737
36. Gerritzen A, Schneweis KE, Scholt B, Brackman HH, Kaiser R, Oldenburg J (1992) Acute hepatitis C in haemophiliacs due to „virus-inactivated“ clotting factor concentrates. *Thromb Haemost* 68, 781
37. Kreuz W, Klarmann D, Auerswald G, Auberger K, Gürtler L, Rabenau H, Doerr HW (1993) Absence of hepatitis A after treatment with pasteurised factor VIII concentrates in children with haemophilia A and von Willebrand disease. *Lancet* 341, 446.
38. Lawrence DN (1990) A review of clinical studies evaluating the efficacy of HIV inactivation methods. *Prog Clin Biol Res* 324, 151–160
39. LoGrippo G, Hartmann F (1958) Chemical and combined methods for plasma sterilization. *Bibl Haematol* 7, 225–230
40. Dichtelmüller H, Rudnick D, Breuer B, Gänshirt KH (1993) Validation of virus inactivation and removal for the manufacturing procedure of two immunoglobulins and a 5 % serum protein solution treated with  $\beta$ -propiolactone. *Biologicals* 21, 259–268
41. Norley SG, Löwer J, Kurth R (1993) Insufficient inactivation of HIV-1 in human cryo poor plasma by beta-propiolactone: results from highly accurate virus detection method. *Biologicals* 21, 251–258
42. Statens Serum Institute (1990) Report concerning virus inactivation with 0,3 % v/v Tri-n-butyl-phosphate and 1 % v/v Tween in factor VIII.
43. Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A, Stryker MH (1985) Inactivation of viruses in labile blood derivatives. I. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations. *Transfusion* 25, 516–522
44. Edwards CA, Piet MPJ, Chin S, Horowitz B (1987) Tri(n-butyl)phosphate/detergent treatment of licenced therapeutic and experimental blood derivatives. *Vox Sang* 52, 53–59
45. Mannucci PM (1992) Outbreak of hepatitis A among Italian patients with haemophilia. *Lancet* 339, 819
46. Gerritzen A, Schneweis KE, Brackman HH, Oldenburg J, Hanfland P, Gerlich WH, Caspari G (1992) Acute hepatitis A in haemophiliacs. *Lancet* 340, 1231–1232
47. Normann A, Graft J, Gerritzen A, Brackman HH, Flehmig B (1992) Detection of hepatitis A virus RNA in commercially available factor VIII preparation. *Lancet* 340, 1232–1233
48. Temperley IJ, Cotter KP, Walsh TJ, Power J, Hillary IB (1992) Clotting factors and hepatitis A. *Lancet* 340, 1466
49. Azzi A, Ciappi S, Zakvrzewska K, Morfini M, Mariani G, Mannucci PM (1992) Human parvovirus B19 infection in hemophiliacs first infused with two high-purity, virally attenuated factor VIII concentrates. *Am J Hematol* 39, 228–230
50. Yu MW, Mason BL, Guo ZP, Tankersley DL, Nedjar S, Mitchell FD, Biswas RM (1995) Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet* 345, 1173–1174
51. Yei S, Yu MW, Tankersley DL (1992) Partitioning of hepatitis C virus during Cohn-Oncley fractionation of plasma. *Transfusion* 32, 824–825
52. Wells MA, Wittek AE, Epstein JS, Marcus-Sekura C, Daniel S, Tankersley DL, Preston MS, Quinnan GV (1986) Inactivation and partition of human T-cell lymphotropic virus, type III, during ethanol fractionation of plasma. *Transfusion* 26, 210–213
53. Große-Bley A, Eis-Hübinger AM, Kaiser R, Oldenburg J, Brackmann HH, Schwarz TF, Schneweis (1994) Serological and virological markers of human parvovirus B19 infection in sera of hemophiliacs. *Thromb Haemost* 74, 503–507
54. Santagostino E, Mannucci PM, Gringeri A, Azzi A, Morfini M (1994) Eliminating parvovirus B19 from blood products. *Lancet*, 343, 798
55. Paul-Ehrlich-Institut (1995) Bekanntmachung über Maßnahmen zur Abwehr von Arzneimittelrisiken. Verminderung des Risikos der Übertragung von hämatogenen Viren bei Arzneimitteln, die durch Fraktionierung aus Plasma humanen Ursprungs hergestellt werden. *BAnz* 162, 9636–9637