

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg - Hessen
Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Dr. h. c. Erhard Seifried

Klinische Effizienz eines Pathogeninaktivierungsverfahrens für
Thrombozytenkonzentrate

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Beata Rezny-Kasprzak

aus Lublin

Frankfurt am Main, 2018

Dekan:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. M. Schmidt
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. K. Zacharowski

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Einführung.....	7
1.2. Geschichte der Transfusionsmedizin	8
1.3. Gegenwärtiger Einsatz der Transfusionsmedizin	10
1.4. Transfusionsrisiko heute	12
1.5. Bakteriellies Transfusionsrisiko	14
1.5.1. Risikobewertung der bakteriellen Kontamination.....	14
1.5.2. Herstellung von Thrombozytenkonzentrate.....	17
1.5.3. Symptomatik bakterieller Transfusionszwischenfälle	18
1.5.4. Inzidenz der Transfusionszwischenfälle	19
1.6. Maßnahmen zur Risikominimierung einer transfusionsassoziierten bakteriellen Infektion.....	20
1.6.1. Prävention einer bakteriellen Kontamination.....	20
1.6.2. Begrenzung der Lagerungsdauer	21
1.6.3. Sterilitätstestung	22

1.6.4. Pathogenreduktionsverfahren.....	24
1.6.4.1. Intercept-Verfahren.....	25
1.6.4.2. Mirasol-Verfahren	25
1.6.4.3. THERAFLEX UV-Verfahren	26
1.6.4.4. S-303-Verfahren	26
2. Zielsetzung der Arbeit.....	29
3. Material.....	30
3.1. Apparatur.....	30
3.2. Verbrauchsmaterialien	30
3.3. Auswahl relevanter Bakterienspezies	31
4. Methoden.....	35
4.1. Herstellen einer Bakterienkultur.....	35
4.2. Verdünnungsreihe einer Bakterienkultur mit NaCl.....	35
4.3. Auszählen und Bestimmung der Konzentration.....	36
4.4. Spiken von Blutprodukten.....	37
4.5. Entnahmen von Proben unter sterilen Bedingungen.....	37

4.6. Untersuchung mittels BacT/ALERT	37
4.7. Untersuchung von Proben mit Hilfe von Blutagarplatten.....	38
4.8. Aufbau einer Produktionslinie für Pool-TKs außerhalb des Herstellungslabors	38
4.9. Pathogenreduktion mittels Intercept	39
4.9.1. Zugabe von Amotosalen	41
4.9.2. UVA-Bestrahlung.....	42
4.9.3. CAD-Phase.....	42
4.10. Studien	43
4.10.1. Ablauf der Intercept-Pathogenreduktionsstudie für Vollblutpräparate	43
4.10.1.1. Sterilitätskontrolle der Vollblutpräparate.....	43
4.10.1.2. Spiken der Vollblutpräparate mit Bakterien.....	43
4.10.1.3. Konzentrationskontrolle vor BC-Herstellung	44
4.10.1.4. Kontrolle der Keimkonzentration im BC	44
4.10.1.5. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-TK.....	44
4.10.1.6. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-TK vor Inaktivierung.....	45
4.10.1.7. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-TK vor der CAD-Phase	45

4.10.1.8. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-TK nach der CAD-Phase	46
4.10.1.9. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-TK am 5.Tag nach der Pathogenreduktion	46
4.10.1.10. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-TK am 7.Tag nach der Pathogenreduktion	46
4.10.2. Ablauf der Intercept-Pathogenreduktionsstudie für Pool-/ oder Apherese- Thrombozytenkonzentrate	48
4.10.2.1. Sterilitätskontrolle der TKs	48
4.10.2.2. Spiken der TKs mit Bakterien	48
4.10.2.3. Kontrolle der Keimkonzentration im TK vor Inaktivierung	48
4.10.2.4. Kontrolle der Keimkonzentration im TK vor der CAD-Phase (siehe Punkt 4.10.1.7).	49
4.10.2.5. Kontrolle der Keimkonzentration im TK nach der CAD-Phase (siehe Punkt 4.10.1.8).	49
4.10.2.6. Kontrolle der Keimkonzentration im TK am 5.Tag nach der Pathogenreduktion (siehe Punkt 4.10.1.9).	49
4.10.2.7. Kontrolle der Keimkonzentration im TK am 7.Tag nach der Pathogenreduktion (siehe Punkt 4.10.1.10).	49

5. Ergebnisse	51
5.1. Phase 1: Wachstumskinetik von Bakterien in Thrombozytenkonzentraten.....	51
5.2. Phase 2: Vollblutexperimente.....	59
5.3. Phase 3: Experimente an Pool-TKs	66
5.4. Phase 4: Experimente an Apherese-TKs.....	73
6. Diskussion	80
7. Zusammenfassung	90
8. Summary	92
9. Literaturverzeichnis	94
10. Tabellenverzeichnis	109
11. Abbildungsverzeichnis.....	111
12. Abkürzungsverzeichnis	113

1. Einleitung

1.1. Einführung

Auch in der Zeit der Hightech-Medizin ist es bisher nicht gelungen künstliche Sauerstoffträger zu entwickeln und damit ein alternatives Arzneimittel zu Erythrozytenkonzentraten zu erhalten. Denn nur der menschliche Körper ist in der Lage, das lebenswichtige Blut mit seinen vielfältigen Funktionen selbst zu bilden, so dass man in der Zukunft weiterhin auf Blutspenden angewiesen bleibt. Viele Operationen, Transplantationen und Behandlungen von Krebspatienten sind erst dank moderner Transfusionsmedizin möglich geworden. Gleichzeitig ist eine schnelle Verfügbarkeit von Blutprodukten bei schweren Verletzungen und lebensbedrohlichen Krankheiten unerlässlich. Da sich Deutschland in einer demographischen Bevölkerungsentwicklung befindet, ist es derzeit schwer eine Prognose für den Bedarf an Blutkomponenten vorherzusagen. Demzufolge wird bei ansteigender Krebsinzidenz ein steigender Bedarf an Thrombozytenkonzentraten zu erwarten, gleichzeitig werden aber potentielle Spender abnehmen (1). Andererseits werden ständig neue Operationstechniken entwickelt, die den Transfusionsbedarf womöglich reduzieren werden. Auch eine kontinuierliche Diskussion über die Transfusionstrigger hat mit dazu geführt, dass neben einem liberalen Transfusionsmanagement auch ein restriktives Transfusionsmanagement praktiziert wird. Die Zukunft wird zeigen welches Konzept für welche Patienten am besten geeignet sein wird, um eine optimale Versorgung zu erreichen und transfusionsbedingte Nebenwirkungen zu minimieren.

Trotz des enormen medizinischen Nutzens der Bluttransfusion gilt auch hier der Hippokratische Grundsatz „Primum non nocere“ (lat.: zu allererst, nicht schaden!). Unter diesem Aspekt bleibt die Erkennung der hiermit verbundenen Risiken sowie die Etablierung effektiver Maßnahmen zu deren Reduktion eine der wichtigsten Aufgaben der Transfusionsmedizin (2).

1.2. Geschichte der Transfusionsmedizin

Nicht erst Johann Wolfgang von Goethe erkannte, dass das Blut „ein ganz besonderer Saft“ ist. Schon in der Antike galt Blut als Symbol des Lebens und des Bewusstseins. Seine Zufuhr bedeutete Kraft und Gesundheit, sein Verlust dagegen Krankheit und Tod. Bereits im alten Ägypten galt Bluttrank als Lebenselixier, das den leprakranken Pharaonen Heilung erbringen sollte. Die alten Römer sahen im Blut ein Heilmittel gegen Epilepsie (3).

So empfahl Plinius „fallsüchtigen“ Patienten, das Blut der gefallenen Gladiatoren zu trinken (4).

Die Blutübertragung von einem Individuum auf ein Anderes mittels Infusion ist somit keine neue Erfindung. Entscheidend dafür war im Jahre 1628 die Entdeckung des Blutkreislaufes durch den englischen Arzt William Harvey. Nach mehreren gescheiterten Versuchen wurde die erste erfolgreiche homologe Bluttransfusion an Hunden um das Jahr 1666 in England unter Leitung R.Lower durchgeführt. Ermutigt durch solche Erfolge wurden die ersten Transfusionen von Tierblut auf Menschen erprobt. In den nächsten Jahrhunderten wurde diese Art der Bluttransfusion immer wieder angewandt, wobei die Indikationen nicht nur äußerst vielfältig waren, sondern auch kurios. Die meisten Patienten überlebten derartige Behandlungen nicht, so dass die Chirurgia transfusoria in Verruf geriet (5).

Erst Anfang des 18. Jahrhunderts wurden die Tierversuche zur Bluttransfusion erneut aufgenommen. Die erste homologe Transfusion am Menschen gelang dem Londoner Physiologen und Geburtshelfer James Blundell im Jahre 1818. Den Ruf als „Vater der modernen Transfusionsmedizin“ erwarb sich Blundell jedoch einige Jahre später. Er etablierte die Bluttransfusion als erfolgreiche Therapiemaßnahme bei Wöchnerinnen, die einen massiven Blutverlust erlitten hatten (6).

Im 19. Jahrhundert begann die intensive naturwissenschaftliche Erforschung des Blutes. Den Grundstein für die moderne Transfusionsmedizin legte der Wiener Arzt Karl Landsteiner, der 1901 die Blutgruppen des ABO-Systems entdeckte und dafür im Jahre 1930 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde (7). Zusätzliche Fortschritte

im Hinblick auf die Sicherheit der Bluttransfusion brachten die Entdeckung weiterer Blutgruppensysteme wie z.B. des Rhesus-Merkmals sowie die Einführung eines prätransfusionellen Kompatibilitätstests durch Ottenberg (8).

Das Problem der Antikoagulation und Konservierung des Blutes verhinderte lange Zeit die indirekte Bluttransfusion. 1914 wurde Natriumcitrat zur Gerinnungshemmung eingeführt und so begann die Ära der Blutkonservierung und Errichtung der Blutbanken. Die Gründung der ersten Blutbank fand 1919 im Rockefeller-Institut in den USA statt (9).

Trotz der erzielten Fortschritte nach der Einführung der blutgerechten majorkompatiblen Transfusion traten weiterhin schwerwiegende Transfusionszwischenfälle auf. Anfang des letzten Jahrhunderts kam es immer wieder zu Infektionsübertragungen nach Transfusion. Im Jahre 1915 wurde von ersten Syphilisinfektionen im Rahmen der Bluttransfusion berichtet, 1947 stand der Treponema-pallidum-Hämagglutinationstest (TPHA-Test) als Nachweismethode zur Verfügung (10; 11).

Die ersten Hepatitisfälle nach Transfusionen wurden 1943 bekannt. Bis in die 80er Jahre hinein stand die Hepatitisübertragbarkeit im Mittelpunkt der Forschung. 1965 entdeckte Blumberg das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), womit das Spenderblut seit 1968 zum ersten Mal auf potentielle Hepatitis-B-Infektion getestet werden konnte. 1971 war eine entsprechende Nachweismethode für das Virus vorhanden (5; 12).

Im Jahre 1982 kam es zu ersten HI-Virus-Übertragungen nach Bluttransfusionen und im Jahre 1989 folgte die Entdeckung und Beschreibung des Hepatitis C-Virus (HCV) (12).

Durch weitere Entwicklungen und Forschungen wurde das Spenderscreening um die Testung auf HCV-Antikörper und HIV-Antikörper erweitert. Beim DRK Blutspendedienst Baden – Württemberg – Hessen werden seit 1997 alle Spenden auf HIV-1, HBV und HCV und seit 2000 auf HAV und Parvovirus B19 mittels Nukleinsäure – Amplifikations – Technik (NAT) – zunächst auf freiwilliger Basis –

untersucht. Im Jahre 1999 wurde die NAT-Untersuchung vom Paul Ehrlich Institut für HCV und 2004 für HIV-1 gesetzlich vorgeschrieben (13; 14).

Andere Infektionskrankheiten, wie die variante Form der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung (vCJK), müssen im Hinblick auf ihre Transfusionsrelevanz noch infektionsepidemiologisch bewertet werden (15; 16). Im Gegensatz zu der klassischen Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJK) ist bei der neuen Variante (vCJK) das veränderte Prion-Protein auch außerhalb des Gehirns, z.B. in den Gaumenmandeln und in der Milz, nachgewiesen worden. Da es sich dabei um lymphatische Organe handelt, können die Immunzellen in den Kreislauf gelangen. Eine Übertragung der vCJK ist durch Blutpräparate möglich, zumal die üblichen Pathogeninaktivierungsverfahren gegen Prion-Proteine unwirksam sind. In England geht man von einem möglichen Zusammenhang bei drei vCJK – Fällen nach Bluttransfusionen aus, in Deutschland sind bisher keine Patienten mit vCJK bekannt (17; 18).

1.3. Gegenwärtiger Einsatz der Transfusionsmedizin

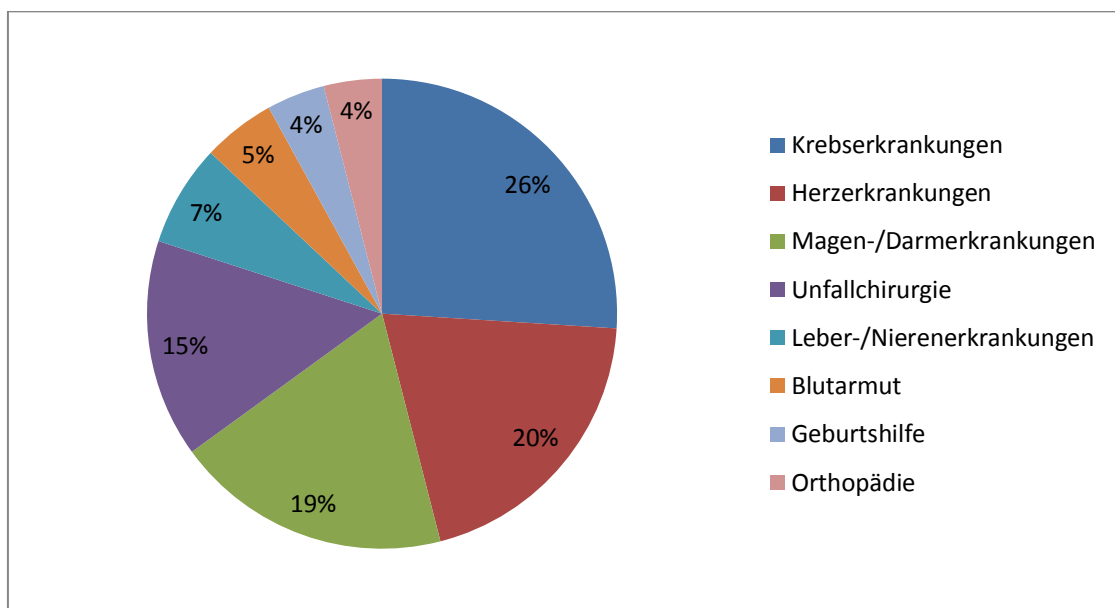
Aus dem Blut wird eine Vielzahl an Blutkomponenten (Erythrozyten-, Thrombozyten-, Granulozytenkonzentrate, Stammzellpräparate) und Blutprodukten (Albumin, Gerinnungspräparate, IgGs, etc) gewonnen sowie hergestellt. Dabei handelt es sich entweder um Produkte aus Einzelspenden oder gepoolte Präparate. Eine genauere Übersicht gibt die Tabelle 1 (19). Alle Blutpräparate unterliegen in Deutschland zusätzlich dem Arzneimittel – / und Transfusionsmittelgesetz.

Weltweit werden pro Jahr circa 75 Millionen Blutspenden benötigt (20). Alleine in Deutschland sind das knapp 5 Millionen Blutspenden jährlich oder umgerechnet ca. 15.000 Blutspenden am Tag. Der hohe Bedarf an Blutpräparaten ist in erster Linie eine Folge des medizinischen Fortschritts. Fast 30% des gespendeten Blutes werden im Rahmen der Krebstherapie transfundiert (Abbildung 1). Größere Mengen an Vollblutspenden werden auch zur Behandlung von gastrointestinalen oder kardialen Erkrankungen oder Verkehrsunfallopfern gebraucht (21).

Tabelle 1. Blutpräparate aus Vollblut- und Apherese-Spenden.

Produkte aus Einzelspenden	Gepoolte Blutplättchenprodukte	Produkte aus Plasmapools
Erythrozytenkonzentrate (EK) Thrombozytenkonzentrate (TK) Stammzellpräparate Granulozyten aus Apherese Lymphozyten aus Apherese Gefrorenes Frischplasma (GFP)	Pool-TK aus Buffy-Coat	Albumin Immunglobuline Fibrinkleber Gerinnungsfaktoren (PPSB, FI, FVII, FVIII, vWF, FIX, u.a.) Inhibitoren (Antithrombin, C1-Esteraseinhibitor, etc.) GFP mit SD (solvent/detergent) Pathogen-Inaktivierung

Abbildung 1. Verteilung der Blutspenden in der Medizin.



Lediglich 3 – 7% der Bevölkerung spenden regelmäßig Blut in Deutschland, obwohl mehr als 30 % gesundheitlich und aufgrund der Spenderauswahlkriterien dazu in der Lage wären. Durch demographische Entwicklung wird zukünftig die Zahl der potentiellen Spender in Deutschland abnehmen. Gleichzeitig steigt bei zunehmend invasiveren Eingriffen und Behandlungen bis ins hohe Alter der Patienten der Bedarf an Blutpräparaten weiter an. Aus diesem Grund ist es wichtig, Blutpräparate so sparsam und „Indikations-gesteuert“ wie möglich einzusetzen. Andererseits besteht die Möglichkeit sowohl das Lebensalter von Spendern zu erhöhen sowie durch neuere Antikoagulanzen und Stabilisatoren die Haltbarkeit von Blutprodukten so zu verlängern, dass hierdurch keine Sicherheitsrisiken für den Patienten entstehen (22).

1.4. Transfusionsrisiko heute

Die Risiken der Bluttransfusion sind vielfältig. Dabei unterscheidet man akute und verzögert auftretende Transfusionsreaktionen, die in der Tabelle 2 dargestellt sind (23).

Auch heutzutage erweckt die Anwendung von Blutprodukten bei vielen Patienten Angst vor möglicher Übertragung von Infektionskrankheiten. Als transfusionsmedizinisch relevante Krankheitserreger gelten nach heutigem Wissen:

- Viren: HIV 1/2, HCV, HBV, CMV(HHV5), HAV, HEV, Parvovirus B19, HTLV I/II, WNV, SARS Coronavirus (Tröpfcheninfektion, transfusionsmedizinisch von untergeordneter Bedeutung), EBV, HHV8, HGV, TTV, Dengue Virus, Chikungunya Virus, Usutu Virus,
- Prionen
- Bakterien: *Escherichia coli*, Salmonellen, *Yersinia enterocolitica* und *pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa/fluorescens/putida*, *Mycobacteria tuberculosis/leprae*, Brucellen, Treponemen, *Borelia recurrentis*, Rickettsien, *Klebsiella pneumoniae*, *Propionibacterium acnes* etc.
- andere: Würmer (Filariosen), Protozoen (u.a. *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium ovale/vivax/malariae/falciparum*, Babesien, Leishmanien, Trypanosomen) (13).

Durch den HIV-Skandal Anfang der 90er Jahre rückten transfusionsassoziierte Virusübertragungen in den Mittelpunkt des Interesses der Transfusionsmedizin sowie der Gesellschaft (24). Neben einer kritischen Spenderselektion ermöglichte nicht zuletzt die Einführung von modernen molekularbiologischen Screeningmethoden, wie die der Realtime-PCR kontinuierliche Verbesserung der Sicherheit der Transfusionstherapie.

In Deutschland findet routinemäßig im Spenderscreening eine Untersuchung auf Hepatitis-A-, Hepatitis-B-, Hepatitis-C-Viren, humane Immundefizienzviren 1 / 2, Parvoviren B19 und humane Zytomegalieviren (HCMV) statt. Alle Spenden werden dabei sowohl auf Virusantikörper als auch auf Virusantigene oder auf Virus-DNA (DNA: Desoxyribonukleinsäure) bzw. -RNA (Ribonukleinsäure) von HBV, HIV und HCV getestet. Dank dieser Maßnahmen konnte das Restinfektionsrisiko auf 1:10,88 Millionen für Hepatitis C-Viren, 1:4,3 Millionen für HIV-1-Viren und 1:360.000 für Hepatitis B-Viren minimiert werden. Dagegen kommen bakterielle transfusionsassoziierte Infektionen 10- bis 100-mal häufiger vor (22).

Tabelle 2. Einteilung der Nebenwirkungen bei Anwendung von Blutprodukten.

Akute Nebenwirkungen	Verzögerte Nebenwirkungen
Hämolytische Reaktion vom Soforttyp	Hämolytische Reaktion vom verzögerten Typ
Febrile, nicht-hämolytische Transfusionsreaktion	Posttransfusionelle Purpura PTP
Allergische Transfusionsreaktion	vCJD
Bakterielle Kontamination	Transfusionsassoziierte Virusinfektionen
Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)	Transfusionsassoziierte Parasitosen
Transfusionsassoziierte akute Volumenbelastung (TACO)	Transfusionsassoziierte (TA-) Graft-versus Host-Reaktion (GvHD)
Hypothermie	Transfusionshämolyse
Hyperkaliämie	Hemmkörperbildung bei Plasmatransfusion
Hämolytische EKs	
Zitratreaktion	

1.5. Bakterielles Transfusionsrisiko

Bakterielle Kontaminationen von Blutprodukten stellen weiter eine große Herausforderung in der Transfusionsmedizin dar. Dabei sind vor alle Thrombozytenkonzentrate gefährdet, da diese bei $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Diese Temperatur stellt für viele Bakterienstämme gute Wachstumsbedingungen dar.

1.5.1. Risikobewertung der bakteriellen Kontamination

Grundsätzlich kommen als potentielle Kontaminationsquellen endogene und exogene Keime in Frage (25).

Endogene Erreger befinden sich zum Zeitpunkt der Blutspende im Blut des Spenders. Im Rahmen einer akuten oder subchronischen bakteriellen Infektion des Intestinaltraktes, Osteomyelitiden oder Endokarditiden kann eine transiente Bakteriämie des Spenders beobachtet werden. Auch nach zahnärztlichen oder endoskopischen Eingriffen werden regelhaft Bakterien in die Blutbahn eingeschwemmt. Zu dieser Erregergruppe zählen insbesondere *Treponema pallidum*, *Brucella* spp., *Salmonella* spp., orale Streptokokken und *Yersinia enterocolitica* (26). Eine gründliche Spenderanamnese sowie Spendertestung auf Syphilis-Antikörper gehören zu den wichtigsten Präventivmaßnahmen gegen endogene Bakterien (27).

Im Vordergrund der exogenen Erreger stehen Keime der residenten und transienten Hautflora des Spenders oder des medizinischen Personals wie Staphylokokken, Corynebakterien und Bacillusarten, die sich üblicherweise durch eine geringe Pathogenität auszeichnen. Zu den exogenen Bakterien zählen auch solche, die aus kontaminiertem Umfeld, wie z.B. unsterilen Lösungen, Blutbeuteln oder Oberflächen stammen. Hier handelt es sich in der Regel um gram-negative Bakterien wie Pseudomonaden und Enterobakterien, bei denen das Risiko der letalen Sepsis im Rahmen bakterieller Kontamination höher ist. Die Häufigkeit der Kontamination mit exogenen Mikroorganismen lässt sich im Gegensatz zu den endogenen Keimen durch aseptische Sammel- und Verarbeitungsverfahren beeinflussen (26).

Die klassische Einteilung der als potentielle Kontaminationsquelle der Blutprodukte fungierten Mikroorganismen in pathogen, fakultativ pathogen und apathogen für den Menschen ist nun sehr beschränkt anwendbar. Bei intravenöser Applikation von Mikroorganismen, z.B. im Rahmen einer Bluttransfusion, werden jegliche spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen umgangen. Gleichzeitig sind die meisten Empfänger von Blutkomponenten immunsupprimiert (26). Somit leuchtet es ein, dass unter natürlichen Bedingungen als harmlos anzusehende Corynebakterien (28; 29) oder *Staphylococcus epidermidis* vor allem bei immungeschwächten Patienten schwere Infektionen oder transfusionsbedingte Todesfälle hervorrufen können (30; 31; 32). *S. epidermidis* kann in Thrombozytenpräparaten innerhalb weniger Tage Konzentrationen

bis zu 10^{10} pro ml erreichen (33). Laut Literatur werden bis zu 10^4 koagulasenegative Staphylokokken in einer transfundierten Blutkomponente (Keimzahl $< 10^2$ pro ml) von den meisten Patienten toleriert (34). Allerdings hängt der Schweregrad eines Transfusionszwischenfalls nicht nur von der applizierten Keimkonzentration ab, sondern auch von Faktoren wie Spezies, Virulenz, Patientenstatus oder Antibiotikatherapie. Eine Definierung der Bakterienmenge, die noch akzeptabel wäre, ist somit kein verlässlicher Sicherheitsparameter.

Eine besondere Problematik stellen sporenbildende Bakterien, wie ubiquitär verbreiteter *Bacillus cereus*, dar. Seine Sporen sind gegen die alkoholischen Desinfektionsmittel zur Vorbehandlung der Punktionsstelle resistent (35). Außerdem hat *Bacillus cereus* die Fähigkeit Enterotoxine zu bilden, die u.a. hämolytisch und zytotoxisch wirken und nach parenteraler Applikation einen septischen Schock auslösen können (36; 37). In der Literatur sind schwere und tödlich verlaufende Transfusionszwischenfälle durch *Bacillus cereus* publiziert worden (38; 39).

Gram-negative Bakterien wie Enterobacteriaceae und Pseudomonaden nehmen einen besonderen Stellungswert in der Transfusionsmedizin ein. Ihre äußere Zellmembran besteht aus pyrogen wirkendem Endotoxin. Chemisch handelt es sich dabei um Lipopolysaccharide (LPS), die aus einem hydrophilen Polysaccharid- und einem Lipidanteil aufgebaut sind. Die Fieberschwelle des Menschen liegt bei 1-3,5 ng LPS pro kg Körpergewicht (Europäisches Arzneibuch) (26). Nach artifizieller Kontamination der Erythrozytenkonzentrate mit *Yersinia enterocolitica* bzw. *Enterobacter agglomerans* konnten nach 4 Wochen Lagerung bei 4°C LPS-Konzentrationen bis zu 1000 ng/ml nachgewiesen werden (40). Laut Food and Drug Administration dürfen mit parenteral zu verabreichende Arzneimittel maximal 0,5 ng/kgxh LPS appliziert werden (41). Eine Kontamination eines Blutproduktes mit einer großen Anzahl auch bereits abgestorbener Bakterien kann durch deren Zellmembranbestandteile (LPS) beim Empfänger innerhalb von weniger Minuten nach Applikation einen Endotoxin-induzierten Schock verursachen. Somit ist es zwingend notwendig, Blutprodukte von Pathogenen und Pyrogenen frei zu halten. Sogenannte Superantigene, z.B. das Toxic-Schock-Syndrom-

Toxin1 von gram-positivem *Staphylococcus aureus*, können klinische Symptome auslösen, die denen des Endotoxin-Schocks ähneln (42).

1.5.2. Herstellung von Thrombozytenkonzentrate

Aufgrund intensiver Desinfektionsmaßnahmen der Punktionsstellen ist die Bakterienkonzentration im Blutausgangsprodukt anfangs sehr gering. Da Bakterien jedoch komplette Mikroorganismen sind, können sich diese im Gegensatz zu Viren in den Blutprodukten selbstständig vermehren. Somit kann am Ende der Lagerzeit eine relevante Bakterienkonzentration erreicht werden, die zum einen beim Patienten einen septischen Schock oder bei gram-negativen Bakterien (Bakterienwand enthält bei gram-negativen Bakterien Lipopolysaccharide) auch einen Endotoxinschock auslösen können.

Eine Lagerung bei 4°C vergleichbar zu Erythrozyten wird gegenwärtig erforscht. Es gibt jedoch auch Bakterien wie zum Beispiel *Yersinia enterocolitica*, die in der Lage sind sich auch bei 4°C zu vermehren.

Momentan stehen in Deutschland zwei gleichwertige Thrombozytenpräparate zur Verfügung – sogenannte Pool-Thrombozytenkonzentrate (Pool-TK) und Apherese-Thrombozytenkonzentrate (A-TK), die sich voneinander in ihrem Herstellungsprozess unterscheiden. Beide Thrombozytenpräparate haben den gleichen therapeutischen Effekt und sind leukozytendepletiert (Leukozytengehalt $< 1 \times 10^6$ pro Thrombozytenkonzentrat) (43; 44).

Beim Aphereseverfahren werden mittels Zellseparatoren von einem Spender 1 bis 3 Apherese-Thrombozytenkonzentrate (A-TK) gewonnen. Die Thrombozyten sind in etwa 200 – 300 ml Plasma suspendiert bei einem Thrombozytengehalt zwischen $2,4 - 4 \times 10^{11}$ (43).

Pool-Thrombozytenkonzentrate (Pool-TK) werden aus der Vollblutspende in einem mehrstufigen Prozess hergestellt. Nach der Zentrifugation des Vollblutpräparates wird zunächst ein thrombozytenhaltiges Buffy-Coat gewonnen. Aus 4-6 blutgruppengleichen aber von unterschiedlichen Spendern stammenden Buffy-Coats werden im nächsten Schritt die Thrombozyten angereichert. Diese sind in 200-350 ml Plasma oder

Plasmaersatzlösung suspendiert. Bei der Verwendung von Plasmaersatzlösungen beträgt der Restplasmagehalt etwa 80-100 ml. Der Thrombozytengehalt liegt bei circa $2,4-3,6 \times 10^{11}$ (43; 45). Unabhängig vom Herstellungsverfahren müssen die fertigen Thrombozytenkonzentrate mindestens 2×10^{11} Thrombozyten enthalten.

Jährlich werden in Deutschland ca. 350.000, weltweit mehr als 5 Millionen, Thrombozyteneinheiten transfundiert, wovon 60% durch Apherese und 40% aus Vollblutspenden gewonnen werden (46). Die Kontaminationsrate von Apherese-TKs und Pool-TKs liegt im selben Bereich, die beispielsweise im Jahre 2005/2006 0,15% betrug (47).

Die Thrombozytensubstitution findet Einsatz in der Therapie von thrombozytopenischen Blutungen und zur Blutungsprophylaxe bei thrombozytären Bildungs- und Umsatzstörungen. Beide können auf einer Erniedrigung der Thrombozytenzahl oder einer Funktionsbeeinträchtigung der Thrombozyten beruhen. Die Indikationsstellung hängt von der Thrombozytenzahl und deren Funktion, dem Blutungsrisiko sowie der vorliegenden Grunderkrankung ab (48). Die häufigste Indikation zur Thrombozytentransfusion ist die Thrombozytopenie bei Patienten mit einer primären oder sekundären Knochenmarkinsuffizienz, z.B. im Rahmen einer Chemotherapie bei hämatologischen Erkrankungen. Auch starke Blutverluste oder Massivtransfusionen können zu einer Thrombozytopenie führen. Bei einer Thrombozytenzahl unter 50/nl stellt jede schwerwiegende Blutung eine zwingende Indikation zur Thrombozytengabe dar (43). Bei einer prophylaktischen Thrombozytentransfusion liegt der Transfusionstrigger gegenwärtig bei 10/nl.

1.5.3. Symptomatik bakterieller Transfusionszwischenfälle

Die klinische Symptomatik eines bakteriell bedingten Transfusionszwischenfalls kann sehr variabel sein. Die beobachteten Symptome sind unspezifisch und in ihrem Schweregrad von Faktoren wie Bakterienspezies, Virulenz, Keimkonzentration, Immunitätslage des Empfängers sowie begleitende Antibiotika-Therapie abhängig. Am häufigsten treten Schüttelfrost, Fieber und Blutdruckabfall zu Beginn, während oder kurz nach der Transfusion auf. Bei schwerwiegenden Verläufen beobachtet man

zunächst Fieber $> 38,5^{\circ}\text{C}$, Blutdruckabfall, Tachykardie, Tachypnoe, Schwindel und Erbrechen. Diese können im Verlauf in einen septischen Schock mit Entstehung einer Verbrauchskoagulopathie (dissiminierte interavasale coagulopathy; DIC) und eines Multiorganversagens enden. Ursächlich dafür sind die bakteriellen Endo- und Exotoxine, die das Immunsystem aktivieren und zu einer überschießenden Freisetzung von Zytokinen und Lipidmediatoren führen (22).

1.5.4. Inzidenz der Transfusionszwischenfälle

Die wahre Inzidenz von bakterienbedingten Transfusionszwischenfällen ist schwierig zu ermitteln. Nach Auffassung vieler Autoren kann eine moderate und unspezifische Symptomatik, vor allem bei schwerkranken Patienten, häufig fehlgedeutet oder nicht erkannt werden. Neben dem Risiko für eine bakterielle Infektion durch Blutprodukte bestehen für die Patienten weitere Risiken für eine bakterielle Infektion durch Katheter, andere Applikationen (Medikamente und Infusionen) und vor allem durch den direkten Kontakt mit dem Pflegepersonal und den Ärzten. Erschwert wird die Wahrnehmung auch dadurch, dass ca. 1/3 aller Patienten bereits zum Zeitpunkt der Transfusion unter einer Antibiotikatherapie stehen oder auch eine erhöhte Körpertemperatur haben. Eine zusätzliche Infektion oder eine zusätzliche Temperaturerhöhung wird zwar vom Pflegepersonal dokumentiert, nicht jedoch in allen Fällen ursächlich mit der Transfusion in Zusammenhang gebracht. Mit Inkrafttreten des Transfusionsgesetzes 1998 wurde in Deutschland eine gesetzliche Meldepflicht für unerwünschte Arzneimittelwirkungen bei Blutprodukten geschaffen. Der behandelnde Arzt ist nach §16 dieses Gesetzes verpflichtet, den Verdacht auf schwerwiegende unerwünschte Arzneimittelwirkungen unverzüglich dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) zu melden. Die Registerzahlen des PEI bestätigen, dass der Vorgabe nur teilweise entsprochen wird (26; 49; 50).

In den Jahren 1997 bis 2007 sind dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) 145 Verdachtsfälle von bakteriellen Infektionen durch Blutkomponenten gemeldet worden, in 68 Fällen schien ein Zusammenhang als wahrscheinlich bis gesichert, bei 34 Fällen handelte es sich um Thrombozytenkonzentrate. 14 der gemeldeten bakteriellen Übertragungen (5x Pool-TKs 5x A-TKs und 4x EKs) führten beim Empfänger unmittelbar zum Tode. Die

durch EKs übertragenen Erreger waren *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* und *Yersinia enterocolitica* (2 Fälle). Bei den durch Thrombozytenkonzentrate verursachten Fällen waren *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* und *Klebsiella pneumoniae* (2 Fälle) nachweisbar (51).

Schrezenmeier et al. untersuchten in einer multizentrischen Studie der Blutspendedienste des Deutschen Roten Kreuzes die Kontaminationsrate von Thrombozytenkonzentraten und kamen zu dem Ergebnis, dass sich Bakterien in 1:1.428 Thrombozytenkonzentraten mit Hilfe des BacT/ALERT-Verfahrens nachweisen ließen und bei 1:50 000 TKs schwerwiegende septische Reaktionen nachweisbar waren (47).

1.6. Maßnahmen zur Risikominimierung einer transfusionsassoziierten bakteriellen Infektion

1.6.1. Prävention einer bakteriellen Kontamination

Zur Vorbeugung der bakteriellen Kontamination von Blutprodukten wurden in den letzten Jahren in Deutschland zahlreiche Maßnahmen etabliert. Insbesondere die Hautdesinfektion der Punktionsstelle und das Predonation Sampling tragen zu einer Risikoreduktion bei.

Die Haut des Spenders stellt ein großes Bakterienreservoir dar. Die zweiphasige Desinfektion ermöglicht eine suffiziente Hautdekontamination von oberflächlichen Bakterien. Die Desinfektionsmittel weisen aber gegen Sporen und gegen anaerobe Bakterienspezies in tiefen Hautarealen eine reduzierte bakterizide Wirkung auf (35).

Um die Kontaminationsrate von Bakterien in Blutkomponenten zu reduzieren, wurde bundesweit 2002/2003 das Predonation Sampling eingeführt. Dabei werden die ersten 30-50 ml der Blutspende und somit die mit der Punktion potentiell eingeführten Bakterien in einen separaten Untersuchungsbeutel abgefangen. Anschließend werden die Ventile des Blutbeutel-systems zur Gewinnung der Vollblutspende geöffnet. Das initiale Blutvolumen wird für die Spendertestung verwendet. Mit dem Predonation

Sampling kann das bakterielle Kontaminationsrisiko um ca. 50 % reduziert werden (52; 53; 54; 55).

Um die Bakteriämie des Spenders als Kontaminationsquelle auszuschließen wurden gezielte Spenderausschlusskriterien erarbeitet. Außerdem dürfen nur Personen zur Spendenentnahme zugelassen werden, die unter der Verantwortung einer approbierten ärztlichen Person nach dem Stand der medizinischen Wissenschaft und Technik für tauglich befunden worden sind (56).

Weitere präventive Maßnahmen zur Reduktion der bakteriellen Kontamination von Blutkomponenten sind exemplarisch in der Tabelle 3 dargestellt (46).

Tabelle 3. Präventive Maßnahmen der bakteriellen Kontamination von Blutprodukten.

Präventive Maßnahmen zur Reduktion der bakteriellen Kontamination

Gezielte Erhebung der Anamnese von Blutspendern um Bakteriämierisiko zu minimieren

Zweiphasige Hautdesinfektion mit einem zugelassenen Desinfektionsmittel unter strikter Einhaltung der Einwirkzeit

Predonation Sampling

GMP-gerechte Herstellungsbedingungen mit Kontrolle der Dichtigkeit der Blutbeutel

Prüfung steriler Schlauchschweißverbindungen auf Dichtigkeit

Einhaltung der vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen

Inspektion des Thrombozytenkonzentrates vor Beginn der Transfusion

Personalschulung

1.6.2. Begrenzung der Lagerungsdauer

Ca. 33% der Thrombozytenkonzentrate werden an den Tagen 1-2 transfundiert, ein weiteres Drittel an den Tagen 2-3 und das letzte Drittel an den Tagen 4-5. In den meist tödlich verlaufenden Fällen fand die Thrombozytentransfusion am Ende der

Haltbarkeitsfrist statt. Aus diesem Grund hat der Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit am 09. Juni 2008 das Votum 38 verabschiedet, dass die maximale Lagerdauer der Thrombozytenkonzentrate von 5 auf 4 Tage verkürzt.

1.6.3. Sterilitätstestung

Um die Sicherheit der Blutprodukte zu verbessern wurden im DRK Blutspendedienst verschiedene Bakteriendetektionsverfahren entwickelt, die in Inkubations- bzw. Kultivierungs- und Schnelltestmethoden einteilt werden können.

Das BacT/ALERT – Verfahren (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) ist ein automatisiertes Blutkultursystem, das inzwischen von vielen Ländern (z.B.: Belgien, Schweden, Niederlande, USA, Kanada und Australien) in das Blutspenderscreening routinemäßig eingeführt wurde (57). Als Detektionsparameter dient von Bakterien produziertes CO₂. Die ansteigende CO₂-Konzentration führt zu einem pH-Abfall und damit zu einer Farbveränderung des pH-sensitiven Flaschenbodens, der alle 10 Sekunden von einem Lichtstrahl geprüft wird. Durch veränderte Reflektionseigenschaften nach dem Farbumschlag wird ein optisches und akustisches Signal am Monitor angegeben (58).

Die auf einer Bakterienkultur basierenden Methoden zeichnen sich durch hohe analytische Sensitivität aus, haben jedoch den Nachteil, dass abhängig von der Wachstumskinetik der Bakterienspezies eine Detektionszeit bis zu 7 Tage notwendig ist. Die Nachweisgrenze für BacT/ALERT wird mit 1 CFU/ml angegeben (46). Direkt nach der TK-Herstellung kann die bakterielle Konzentration zwischen 0,003 – 0,03 CFU/ml (1-10 Keime pro Beutel) liegen (23). Dadurch besteht die Gefahr eines Probenfehlers (sample error), d.h. im Untersuchungsmaterial ist kein Bakterium vorhanden und somit erzielt der kulturelle Nachweis ein falsch negatives Ergebnis. Im TK können jedoch Bakterien vorhanden sein, die sich dann im Verlauf der Lagerung exponentiell vermehren können. Dies bestätigen Publikationen von Boekhorst et al., Fang et al. und Eder et al., wo es trotz negativer Screeningergebnisse zu schweren septischen Transfusionszwischenfällen kam (59; 60; 61). Um das Risiko des

Probenfehlers zu reduzieren wird das Probematerial (zwischen 5-10ml) in der Regel 24h nach der Blutspende entnommen.

Pall eBDS® System (enhanced Bacteria Detection System, Pall, New York, USA) ist ein weiteres Kultivierungsverfahren mit einer vergleichbaren analytischen Sensitivität zur BacT/ALERT-Methode (Nachweisgrenze zwischen 1-100 CFU/ml) (46). Mittels eines Oxygen-Analysers wird die O₂ - Konzentration in der Luft über einer Probe aus dem zu untersuchenden TK gemessen. Dabei wird ein Volumen von 2-3 ml entnommen und 24h bei 25 °C inkubiert (62; 63; 64). Die Bakterien mit einem obligat aeroben Stoffwechsel werden durch den O₂-Verbrauch detektiert. Eine Vielzahl von Bakterien ist aber fakultativ anaerob. Zur Energiegewinnung können sie auch anaerobe Stoffwechselprozesse anregen, das wiederum zu falsch negativen Testergebnissen bei diesem Verfahren führen kann. Der endogene Stoffwechsel der Thrombozyten kann ebenso zu einer Erniedrigung der Sauerstoffkonzentration führen. Zur Vermeidung von falsch reaktiven Ergebnissen werden die Thrombozyten aus dem Untersuchungsmaterial entfernt (65) .

Neben den beschriebenen Kulturmethoden wurden zum Bakteriennachweis in Blutkomponenten auch Schnelltestmethoden entwickelt. Schnelltestmethoden bieten die Möglichkeit, Probenvolumina zu einem späteren Zeitpunkt zu entnehmen und damit das Risiko des Probenfehlers zu reduzieren. Zu den bakteriellen Schnelltestmethoden gehören u.a die Real-Time-PCR, die ScansystemTM-Methode (Hemosystem, Marseille, Frankreich) und das Fluoreszenz automatisierte Cell sorting (FACS-Methode). Zu den neueren Schnellmethoden gehören der Platelet PGD Test (Verax Biomedical, Worcester, MA, USA), eine kontinuierliche Sauerstoff-Messung (Oxygen dipping probe, PreSens), automatisierte ELISA Testverfahren, Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) Luminometrie und Nachweisverfahren mit Hilfe von Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) (66; 67).

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion können bakterielle hochkonservative ribosomale DNA-Bereiche (16S-und/oder 23S-rDNA) amplifiziert werden. Die Methode ermöglicht einen schnellen Nachweis (ca. 24h nach TK-Herstellung) einer

bakteriellen Kontamination (68; 69; 70). Derzeit liegt die Nachweisgrenze des Verfahrens zwischen 20 – 50 CFU/ml (23).

Bei der Bakteriendetektion mit Hilfe der FACS-Methode wird die bakterielle DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Thiazol-Orange) markiert. Anschließend passieren die Zellen im Sensor einzeln einen Laserstrahl. Der Nachweis des durch Bakterien gestreuten Lichtstrahles erfolgt mittels Detektoren (Photomultiplier). Die FACS-TM-Methode charakterisiert sich durch eine einfache Anwendung sowie ein schnell verfügbares Testergebnis (71; 72). Die analytische Sensitivität der Methode beträgt zwischen 10^3 - 10^4 CFU/ml (23).

1.6.4. Pathogenreduktionsverfahren

Dank einer Vielzahl von Maßnahmen, wie Entwicklung von modernen Screeningmethoden oder gezielte Spenderauswahlverfahren, wurde die Sicherheit der Blutprodukte enorm verbessert. Trotzdem verbleibt ein Restrisiko für die Übertragung von Viren, Bakterien, Protozoen und Prionen. Dies kann u.a durch ein Testversagen oder durch eine zu niedrige Keimkonzentration im peripheren Blut des Spenders erklärt werden. Des Weiteren kann die Infektion durch unbekannte Erreger ausgelöst werden oder diejenigen, für die keine Testung im Spenderscreening vorgeschrieben ist.

Eine Alternative zur Verbesserung der Sicherheit der Blutprodukte bieten verschiedene Pathogenreduktionsmethoden, die nicht nur eine Behandlung von Plasmapräparaten sondern auch von zellulären Blutprodukten erlauben.

Allen Pathogenreduktionsverfahren ist gemeinsam, dass sie die Replikationsfähigkeit der Mikroorganismen unterbinden, indem durch Applikation von ultraviolettem Licht und/oder Verwendung alkylierender Substanzen irreversible Schäden an der Erbsubstanz entstehen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist eine Inaktivierung der in den Blutprodukten verbliebenen Leukozyten. Damit wird das Risiko einer transfusionsassoziierten Transplantat-gegen-Empfänger Erkrankung (Graft-versus-host disease, GvHD) reduziert. Gegenüber Prionen, die u.a. die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung auslösen können, bleiben die Pathogenreduktionsverfahren ineffektiv.

Man unterscheidet grundsätzlich photodynamische Verfahren (z.B. Riboflavin, Mirasol®, Firma TerumoBCT), photochemische Verfahren (z.B. S59/Amotosalen, Intercept®, Firma Cerus) und eine alleinige Bestrahlung mit UVC (z.B. Theraflex, Macopharma).

1.6.4.1. Intercept-Verfahren

Das Intercept Blood System der Firma Cerus Europe BV ist ein Medizinprodukt, das für die Ex-vivo-Präparation und Aufbewahrung der aus Vollblut und Apherese gewonnenen Thrombozyten, aber auch Plasmapräparate, eingesetzt werden kann. Das Verarbeitungsset ist ein steriles, geschlossenes System mit integriertem Flüssigkeitspfad für den Einmalgebrauch (73). Zur photochemischen Behandlung wird dem Thrombozytenpräparat eine Amotosalen-HCl-Lösung (ein synthetisches Psoralenderivat) zugesetzt, die sich zunächst reversibel an die DNA oder RNA andockt. Durch Bestrahlung mit UVA von 320 bis 400 nm kommt es zu einer photochemischen Aktivierung des Psoralenmoleküls, wodurch eine kovalente Bindung zwischen Amotosalen und Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren entsteht. Vor der Überführung der behandelten Thrombozyten in den Lagerungsbeutel werden das restliche Amotosalen sowie ungebundene Photoprodukte durch eine Adsorptionsvorrichtung während einer Inkubationsphase von bis zu 16 Stunden auf ein niedriges Niveau reduziert. Das Intercept-System ist nicht auf Erythrozytenkonzentrate anwendbar, da das UVA-Licht durch hämoglobinhaltige Erythrozyten adsorbiert wird (24; 74).

1.6.4.2. Mirasol-Verfahren

Das Mirasol-System (TerumoBCT Biotechnologies/Terumo Corp.) gehört zum sogenannten photodynamischen Verfahren. In diesem Fall werden die Blutpräparate mit Riboflavin (Vitamin B2) versetzt, welches hier als ein Photosensitizer dient. Zunächst entsteht eine Komplexbildung zwischen Riboflavin und Nukleinsäuren. Durch UVB-Bestrahlung wird der Photosensitizer angeregt und es kommt zu einer Photooxidation - vor allem der Guaninbasen, welche die Replikation verhindern (75). Bei fehlender Toxizität des natürlich vorkommenden Vitamins B2 erübrigt sich die anschließende Adsorptionsphase. Das Verfahren kann sowohl für Thrombozytenkonzentrate als auch

Einzelspenderplasma angewandt werden. Inzwischen gibt es erste Mirasol-Einsatzversuche auch für Vollblutpräparate (24; 76).

1.6.4.3. THERAFLEX UV-Verfahren

Das THERAFLEX UV-Verfahren ist ein Gemeinschaftsprojekt der Blutspendedienste des Deutschen Roten Kreuzes e.V. und der Firma Micropharma, das prinzipiell für alle Blutpräparate geeignet ist. Durch Applikation des energiereicheren UVC von 254nm kann auf Zugabe von photoaktiven Substanzen verzichtet werden. UVC induziert irreversible Schädigungen der Erbsubstanz, indem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere sowie 6-4 Photoprodukte entstehen. Um eine effiziente und gleichmäßige UVC-Penetration zu erreichen, müssen die Blutprodukte agitiert werden, wodurch die Schichtdicke des Blutpräparates zeitlich und räumlich variiert. Für Thrombozytenkonzentrate beträgt die Bestrahlungszeit weniger als 1 Minute. Beim THERAFLEX UV-Verfahren handelt es sich somit um einen einfach und schnell durchführbaren Prozess, das sich unkompliziert in das bestehenden Herstellungsverfahren einer Blutbank integrieren lässt (24; 77).

1.6.4.4. S-303-Verfahren

Für die Erythrozytenkonzentrate wurde speziell das S303-Verfahren (Intercept Blood System, Cerus Europe BV) entwickelt. Das S-303-Molekül besteht aus einem Anker und Effektor, die durch eine leicht hydrolysierbare Esther-Gruppe (Linker) miteinander verbunden sind. Dank seiner amphipathischen Eigenschaft kann das S-303-Molekül die zellulären Membranen problemlos durchdringen und mit Nukleinsäuren interkalieren. Die selektive Interkalation (nicht-kovalente Bindungen) erfolgt über den Anker, der ein positiv geladener Acridinderivat ist. Durch den Effektor – ein Stickstoff-Lost-Derivat – kommt es zur Alkylierung der Nukleotide und somit zu irreversiblen Quervernetzungen der DNA- und/oder RNA-Stränge und der Replikationshemmung. Die Hydrolyse des Linkers erfolgt durch eine pH-Verschiebung zum physiologischen, neutralen pH im Blutprodukt. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Quervernetzung ist schneller als die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse der Esther-Gruppe, wodurch das Gleichgewicht zu Gunsten der Alkylierung verschoben wird (78).

Nach Zusatz von S-303 zu den Erythrozytenkonzentraten beginnt zunächst eine bis zu 20 Stunden dauernde Inkubationsphase. Anschließend wird in einer weiteren Inkubationsphase das nicht mehr aktive Reaktionsprodukt S-300 mittels Adsorptionsmatrix abgefangen. Im Gegensatz zu den anderen Pathogenreduktionsverfahren wird beim S-303-Verfahren keine UV-Strahlung verwendet. Um unspezifische Reaktionen von S-303 mit zellulären Proteinen zu minimieren wird dem Erythrozytenkonzentrat noch Glutathion als Quencher beigemischt. Toxikologische Studien an Tieren zeigten, dass S-303, S-300 und Glutathion auch in weit höheren Konzentrationen keine unerwünschte Wirkung verursachen (79).

Das S-303-Verfahren befindet sich noch in der klinischen Entwicklung (24; 78). Leider zeigten einige Patienten eine Immunreaktion gegen mit S303-behandelten Blutkomponenten. Im Serum ließen sich spezifische Antikörper gegen S303-Erythrozyten nachweisen, auch bei Menschen, die nicht mit pathogenreduzierten Erythrozyten behandelt wurden (24; 80).

Während die Intercept- und Mirasol-Verfahren eine Marktreife in manchen Ländern Europas und Asiens erreicht haben, sind die S-303- und UVC-Verfahren noch in der klinischen Entwicklung. In Europa haben pathogenreduzierte Plasmen und Thrombozytenkonzentrate unterschiedliche Resonanz. In Frankreich und der Schweiz wird das INTERCEPT für Thrombozytenkonzentrate routinemäßig eingesetzt. In Deutschland reagierte man auf schwere Transfusionszwischenfälle nach der Thrombozytensubstitution zunächst mit einer Verkürzung der Thrombozytenhaltbarkeit um einen Tag. Derzeit befinden sich bundesweit die Pathogenreduktionsverfahren in der Evaluationsphase.

Die Studienergebnisse von McCullough et al erbrachten keine relevanten hämostaseologischen Effizienzunterschiede zwischen den mit Intercept-behandelten und den unbehandelten Thrombozytenkonzentraten (58). In den Plasmapräparaten kommt es zwar nach Pathogenreduktion zu einem Konzentrationsabfall der Gerinnungsfaktoren jedoch ohne signifikante Beeinträchtigung der Patientenbehandlung (81). Aus sämtlichen klinischen Studien geht aber hervor, dass die mit pathogenreduzierten

Thrombozyten behandelten Patienten einen niedrigeren Thrombozytenanstieg, kürzere Transfusionsintervalle und einen höheren Thrombozytenverbrauch hatten. Dies spricht für reduzierte Überlebens- und Wiederfindungsraten der pathogenreduzierten Thrombozyten (82; 83; 84). In der Routine lässt sich jedoch kein erhöhter Verbrauch der vorbehandelten Thrombozyten im Vergleich zu Standardpräparaten feststellen (85). Außerdem beobachtete man während Tierstudien ein erhöhtes Risiko für Lungenschädigung durch aktivierte Thrombozyten (86). Dieser Zusammenhang konnte in der klinischen Zulassungsphase nicht belegt werden (87).

Derzeit laufen Studien, die noch offene Fragen hinsichtlich der therapeutischen Wirksamkeit und des Nebenwirkungsprofils von pathogenreduzierten Thrombozyten prüfen sollen (24).

2. Zielsetzung der Arbeit

In bisherigen Arbeiten wurde für die verschiedenen Pathogeninaktivierungsmethoden stets eine Pathogenreduktion in logarithmischen Stufen angegeben. Der Nachweis einer Pathogeninaktivierung beinhaltet jedoch, dass alle kompetenten Pathogene (hier Bakterien) die eigenständig in der Thrombozytenkonzentraten wachsen können, mit dem Verfahren inaktiviert werden. Dieser wissenschaftliche Nachweis wurde bisher nicht erbracht. Die vorliegende Arbeit gliedert sich daraus folgend in vier Abschnitte, die nachfolgend dargestellt werden.

2.1 Im ersten Abschnitt wird das Wachstumsverhalten von Bakterien in Thrombozytenkonzentraten untersucht.

2.2 Im zweiten Abschnitt erfolgt die Untersuchung der klinischen Effizienz des Intercept – Pathogeninaktivierungsverfahrens. Hierbei werden die Vollblutkonserven mit 8 verschiedenen Bakterien in zwei verschiedenen Konzentrationen und jeweils 4 Replikaten untersucht.

2.3 Im dritten Abschnitt erfolgt die Untersuchung der klinischen Effizienz des Intercept – Pathogeninaktivierungsverfahrens, bei dem Pool-Thrombozytenkonzentrate mit 8 verschiedenen Bakterien in zwei verschiedenen Konzentrationen und jeweils 4 Replikaten untersucht werden.

2.4 Im vierten Abschnitt erfolgt die Untersuchung der klinischen Effizienz des Intercept – Pathogeninaktivierungsverfahrens, bei dem Apherese-Thrombozytenkonzentrate mit 8 verschiedenen Bakterien in zwei verschiedenen Konzentrationen und jeweils 4 Replikaten untersucht werden.

Der Nachweis der Bakterienkeime mit dem BacT/ALERT – Verfahren erfolgt sowohl vor der Pathogeninaktivierung, als auch nach der Inaktivierung sowie am Ende der Haltbarkeit der Thrombozytenkonzentrate.

Die vorliegende Arbeit liefert damit einen wichtigen Beitrag zur Effizienz von Pathogeninaktivierungsverfahren unter Routinebedingungen.

3. Material

3.1. Apparatur

- Beutel-Zentrifuge Hettich/Rotixa
- Manuelle Handpresse
- Blutbeutels-Schlauch-Schweißgerät (TSCD-Gerät)
- Laminar Flow Arbeitsplatz
- Blutkomponenten-Trenngerät (Compomat, Fresenius Hemocare, Bad Homburg, Deutschland)
- Apheresemaschine (AMICUS, Baxter, Wien, Österreich)
- Agitator für Thrombozytenkonzentrate (NUCTUA, Müsingen, Deutschland)
- Brutschrank Thermo (HERAEUS, Langenselbold, Deutschland)
- BacT/ALERT
- Intercept-Illuminator (INT100, CERUS, Concord, USA)

3.2. Verbrauchsmaterialien

- BacT/ALERT SN-Kulturflaschen (bioMérieux, Marcy-I'Etoile, Frankreich)
- BacT/ALERT SA-Kulturflaschen (bioMérieux, Marcy-I'Etoile, Frankreich)
- Compoflex-Leerbeutel (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland)
- 100 µl Pipetten und Spitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- 1 ml Pipetten und Spitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Blutagar-Platten (heipa diagnostics, Heidelberg, Deutschland)
- Ethanol 70% (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 10 ml Spritzen inklusive Kanülen (B.Braun, Melsungen, Deutschland)
- InterSol-Lösung (Fenwal, Lake Zurich, USA)
- 100 µl Pipetten und Spitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Intercept-Vorbereitungsset für Thrombozytenkonzentrate (LV, CERUS, Concord, USA)

→ Blutbeutelssystem mit Leukozyten-Filter für die Herstellung von Thrombozytenkonzentraten (Compostop™ CS Blutbeutelssysteme, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland)

3.3. Auswahl relevanter Bakterienspezies

Die Kontaminationsraten der beiden Thrombozytenpräparate zeigen keinen signifikanten Unterschied und betragen in Deutschland in den letzten Jahren ca. 0,158% für Pool-TKs und 0,114% für Apherese-TKs (88). Ein Restrisiko für eine bakterielle Infektion in Rahmen der Transfusion verbleibt jedoch.

Um die wichtigsten Bakterienspezies für die Testung mit dem Intercept-System auszuwählen wurden mehrere Studien und Paul-Ehrlich-Institut-Datenbanken, bezüglich der bakteriellen Kontaminationsrate von Blutprodukten, des Bakterienspektrums und dessen klinischer Relevanz ausgewertet.

Aus den dem Paul-Ehrlich-Institut gemeldeten Verdachtsfällen von bakteriellen Infektionen durch Blutkomponenten in den Jahren 1997 bis 2008 konnte in den 77 Fällen der Nachweis des Erregers im Endprodukt und beim Spender bestätigt werden. Davon waren bei 38 Fällen Thrombozytenkonzentrate betroffen. Am häufigsten handelte es sich um Mikroorganismen der Hautflora oder des Respirationstraktes wie *Staphylococcus epidermidis* (19 Fälle) und *Staphylococcus aureus* (10 Fälle). In 43 von 77 Fällen wurden Erreger mit mittlerer bis hoher Pathogenität isoliert (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*), in 34 Fällen ließen sich Erreger mit geringer Pathogenität (*Staphylococcus capitis epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*) nachweisen. Tödliche Verläufe wurden in acht von neun Fällen durch Erreger mit hoher Pathogenität verursacht (*Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* und *Streptococcus pyogenes*). Bei einem Empfänger führte ein mit *Staphylococcus epidermidis* kontaminiertes Thrombozytenkonzentrat zu einer tödlichen Sepsis. Sieben von neun Patienten mit einem tödlichen Verlauf hatten eine maligne Grunderkrankung mit einer relevanten Immunsuppression, wie z.B. chronische myeloische Leukämie oder akute myeloische Leukämie (89).

Zwischen 2004 und 2006 wurde in Deutschland eine prospektive multizentrische Studie durchgeführt, in der insgesamt 52243 Thrombozytenkonzentrate mit dem BacT/ALERT-System auf Sterilität unter Routinebedingungen getestet wurden. Die Ergebnisse zeigten ein breites Bakterienspektrum überwiegend der transienten und residenten Hautflora (Tabelle 4) (47), die den Paul-Ehrlich-Institut-Daten ähnlich waren. In den meisten Fällen wurde das langsam wachsende *Propionibacterium acnes* nachgewiesen. Es residiert in den Haarfollikel und Schweißdrüsenausführungsgängen und wird somit von der oberflächlichen Hautdesinfektion nicht erfasst. Ein spät positives Kultursignal erklärt eine hohe Rate an den transfundierten, potentiell oder bestätigt positiven Thrombozytenkonzentraten in der Studie. Propionibakterien gelten als schwach pathogen und lösen bei den meisten Patienten entweder keine Symptome oder mildere Fieberepisoden aus (90; 91; 92; 93).

Tabelle 4. Bakterienspektrum bei der TK-Kontamination.

Keimspezies in potentiell positiven TK (n=98)		Keimspezies in bestätigt positiven TK (n=37)	
<i>Propionibacterium acnes</i>	45	<i>Propionibacterium acnes</i>	20
Bacillusarten 14	14	<i>S.epidermidis</i>	8
andere koagulase neg.Staphylococcen: <i>S.capitis, S.cohnii, S.hominis</i>	14	<i>S.saccharolyticus</i>	4
<i>S.epidermidis</i>	8	<i>S.capitis</i>	3
anaerobe Staphylococcen	5	<i>S.aureus</i>	1
<i>S.aureus</i>	1	<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>S.lugdunensis</i>	1		
Andere	5		

In den mehreren internationalen Studien wird die Problematik des Probefehlers ersichtlich. Sie berichten über schwere septische Transfusionszwischenfälle, auch mit

tödlichen Verläufen, durch negativ getestete Thrombozytenpräparate. Zu den isolierten Keimen gehörten *S.lugdunensis*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.marcescens*, *B.cereus* und *K. pneumoniae* (59; 60; 61; 94).

Auch in der genannten multizentrischen Studie aus Deutschland kam es zu schwerwiegenden Transfusionsreaktionen bei einem Apherese-TK, dass in zwei Einheiten aufgeteilt wurde und in der Sterilitätstestung als negativ befunden wurde. In beiden Fällen konnte sowohl in der Patientenblutkultur als auch im Restmaterial aus dem Thrombozytenpräparat *Klebsiella pneumoniae* isoliert werden. Die erste Einheit 4,1 Tage nach der Herstellung erhielt eine an Non-Hodgkin-Lymphom erkrankte Patientin zur Vorbereitung auf eine Knochenmarktransplantation nach myeloablativer Radiochemotherapie. Posttransfusionell traten respiratorische Insuffizienz und Kreislaufinstabilität auf. Trotz der Antibiose verstarb die Patientin an einem septischen Schock mit Multiorganversagen innerhalb der nächsten 10 Tage. Die zweite Einheit aus derselben Apherese 4,2 Tage nach der Herstellung bekam eine Patientin mit AML. Klinisch reagierte sie mit Fieber und Kreislaufkollaps. Nach Applikation von Katecholaminen und Antibiotika stabilisierte sich ihr Zustand (90).

Die Probe für die BacT/ALERT- und PALL eBDS-Testung wurde 20 Stunden nach der Herstellung, vor der Teilung in 2 Einheiten, gezogen. Beide Testsysteme brachten ein negatives Ergebnis. Die Nachuntersuchung des Spenders, der primär gezogenen Untersuchungsprobe und der weiteren Materialien ergab keinen Anhalt für eine Kontaminationsquelle mit *K. pneumoniae* (90).

Anhand der vorliegenden Daten wurden folgende Bakterienkeime für die Studie ausgewählt (Tabelle 5).

Tabelle 5. Bakterienspektrum für die Studie mit dem Intercept-Verfahren.

Bakterienstamm	Charakterisierung des Stammes
<i>Bacillus cereus</i>	PEI-B-07-23
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEI-B-08-09
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEI-B-05-01
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 43862
<i>Staphylococcus aureus</i>	PEI-B-23-07
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEI-B-13-03
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PEI-B-20-05
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM-11502

4. Methoden

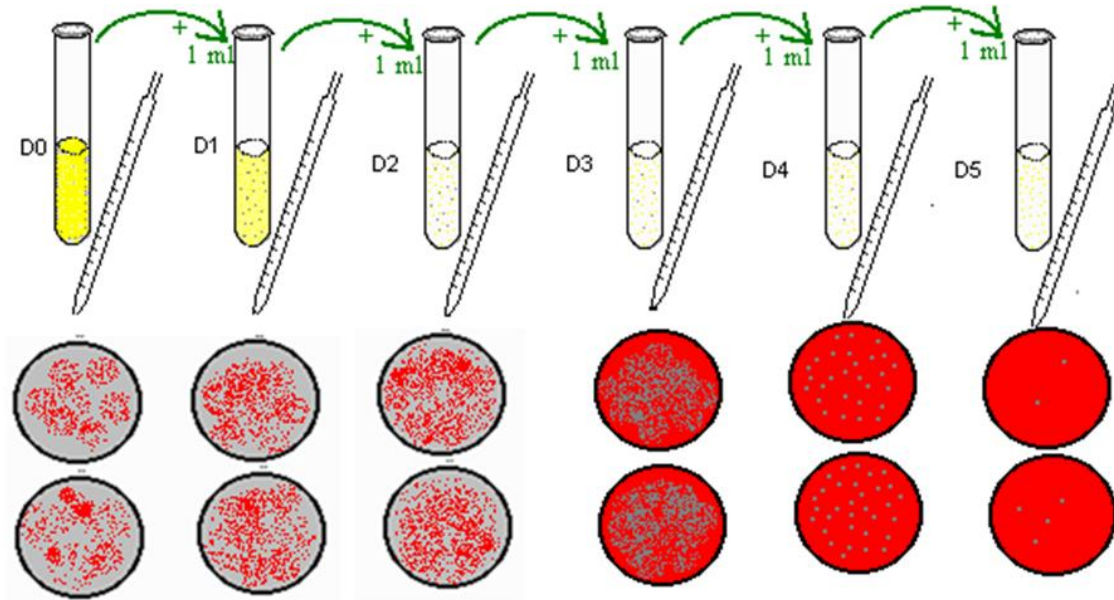
4.1. Herstellen einer Bakterienkultur

Mit einer abgeflamnten Pinzette wird eine sterile Plastikspitze in eine Kolonie auf einer Blutagarplatte gegeben. Die Spitze wird ohne den Rand zu berühren in eine Nährbouillonflasche befördert. Anschließend wird die Bouillon für 24h bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Währenddessen kommt es zur Trübung der klaren Flüssigkeit als Zeichen des bakteriellen Wachstums. Nach 24h beträgt die Anzahl der lebenden Bakterien ca. 1×10^8 CFU/ml. Die genaue Bakterienkonzentration in der Bouillon wird durch Auszählen der Kolonien auf Blutagarplatten bestimmt.

4.2. Verdünnungsreihe einer Bakterienkultur mit NaCl

Für die Verdünnungsreihe werden 50ml Falcon-Röhrchen mit jeweils 9 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung vorbereitet. Die bebrütete Bouillon wird nach der 24h-Inkubation im Brutschrank unter Laminar-Flow-Bedingungen geöffnet und aus der Bouillonflasche (D0) 1ml zu den 9ml NaCl (D1) zugegeben. Mit der gleichen Pipette wird ca. 50-mal langsam auf- und abpipettiert. Für alle Pipettierungen sind Pipettenspitzen mit Filter zu verwenden. Mit einer frischen Pipettenspitze wird exakt 1ml aus dieser Verdünnung (D1) aufgezogen und in die nächste Verdünnungsstufe (D2) übertragen.

Abbildung 2. Verdünnungsprozess.



D0 entspricht der Boullion ca. 10^8 CFU/ml.

1 ml der Konzentration 10^{-1} (D1) + 9ml NaCl = 10ml der Konzentration 10^{-2} (D2)

4.3. Auszählen und Bestimmung der Konzentration

Von den Verdünnungsstufen werden immer zwei Blutagarplatten mit jeweils 500µl beimpft, mit dem Spatel gleichmäßig verteilt und für die nächsten 24h bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Die Bakterienkonzentration kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$x = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

x : Mittelwert

n : Anzahl der Kolonien auf der Agarplatte

x_1 : Kolonien auf der Platte 1

x₂: Kolonien auf der Platte 2

4.4. Spiken von Blutprodukten

Zum Spiken von Blutprodukten wird die gewünschte Endkonzentration durch eine Verdünnungsreihe aus der Bouillon hergestellt und im Kühlschrank ca. 24h aufbewahrt. Zur Dokumentation der korrekten Konzentration werden 2x500µl der Endkonzentration erneut auf Blutagarplatten ausgestrichen und für 24h inkubiert. Danach erfolgt die Auszählung der Kolonien. Anschließend wird ein Adapter mit Membran an ein Thrombozytenkonzentrat mit Hilfe des TSCD Verfahrens angeschweißt. Die Membran wird dreifach mit Octeniderm desinfiziert. Unter Laminar-flow-Bedingungen wird dann ca.1ml der gewünschten Konzentration mittels einer sterilen Kanüle und aufgesetzten Spritze appliziert.

4.5. Entnahmen von Proben unter sterilen Bedingungen

Vor Entnahme von Proben wird der Beutel gut durchmischt. Anschließend wird die Membran des Adapters unter Laminar-flow-Bedingungen dreifach mit Octeniderm desinfiziert. Nach Abtrocknen des Desinfektionsmittels wird die Probe mittels einer sterilen Spritze und Kanüle entnommen.

4.6. Untersuchung mittels BacT/ALERT

Die BacT/ALERT-Methode ermöglicht einen qualitativen Nachweis von vermehrungsfähigen Pathogenen. Unter Laminar-flow-Bedingungen wird zunächst die Kunststoffklappe auf den BacT/ALERT-Flaschen entfernt und die Punktionsstelle mit Octeniderm dreifach desinfiziert. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt werden jeweils eine aerobe und anaerobe Flasche mit ca. 7,5 ml beimpft. Dazu werden ca. 15 ml des Blutproduktes mittels eines Adapters und einer sterilen Spritze aufgezogen. Beide Flaschen sind mit einem fortlaufenden Barcode versehen, der auf dem Auswertungsbogen vermerkt wird. Anschließend werden die Flaschen im BacT/ALERT-Gerät eingelesen und für maximal 7 Tage bebrütet. Der Ausdruck der Verlaufskurve erfolgt am Ende der Inkubationszeit oder bei einem positiven Signal. Jede positive Kulturflasche wird zur Keimdifferenzierung in das Mikrobiologische

Institut der Universität Frankfurt (Prof. Kempf) eingesandt. Ein positives Signal im BacT/ALERT wird als bestätigt eingestuft, wenn aus der Kulturflasche ein Keim nachgewiesen und differenziert werden kann. Erfolgt im mikrobiologischen Institut kein Keimnachweis, wird das Ergebnis als unspezifisch interpretiert.

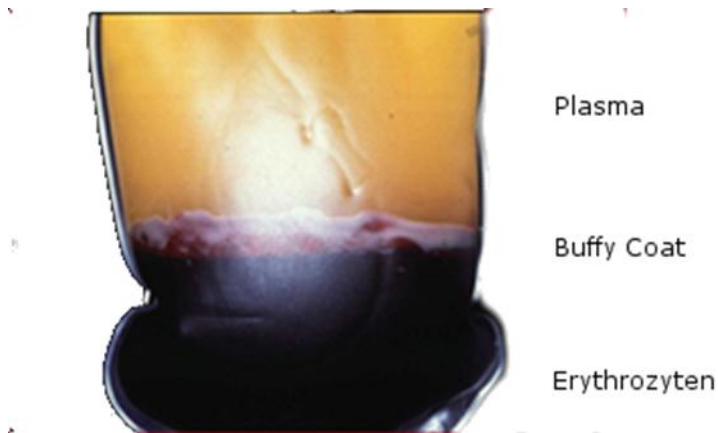
4.7. Untersuchung von Proben mit Hilfe von Blutagarplatten

Zu jedem Untersuchungszeitpunkt werden von der zu untersuchenden Probe Verdünnungsstufen wie unter Punkt 4.2 beschrieben angefertigt. Von jeder Verdünnungsstufe werden jeweils 500µl auf zwei Blutagarplatten ausgestrichen. Nach 24-stündiger Inkubation werden die Bakterienkolonien wie unter Punkt 4.3 beschrieben ausgezählt. Blutagarplatten mit nicht zählbaren Bakterienkolonien werden als NZ (nicht zählbar) definiert.

4.8. Aufbau einer Produktionslinie für Pool-TKs außerhalb des Herstellungslabors

Die Pool-TKs werden gemäß dem routinemäßigen Vorgehen des Deutschen Roten Kreuz hergestellt. Zunächst werden Vollblutspenden bei 3931 x g für 16 Minuten zentrifugiert. Dabei bilden die Erythrozyten den untersten Teil des Sediments und das leichtere Blutplasma den Überstand. Dazwischen bildet sich eine dünne, gelblich-weißliche Zwischenschicht, der sogenannte Buffy coat. Er macht nur einen geringen Teil (ca. 1%) des gesamten Volumens aus und besteht hauptsächlich aus der Thrombozyten- und Leukozytenfraktion (Abbildung 3).

Abbildung 3. Vollblutpräparat nach Zentrifugation.



Mittels eines automatisierten Separators (CompoMat®G4, Fresenius Kabi, Oberursel, Deutschland) werden Erythrozyten von Plasma getrennt und in eigene Beutel abgepresst. Aus dem verbliebenen Material, dem Buffy coat, müssen anschließend Leukozyten und Erythrozytenreste entfernt werden, um das Thrombozytenkonzentrat zu erhalten. Dazu werden zunächst 5 Buffy coats aus je einer Vollblutspende gepoolt, indem man sie steril aneinander schweißt und mit 200ml InertSol-Lösung mischt. Danach folgt eine soft-spin-Zentrifugation bei 340 x g für 9 Minuten und 40 Sekunden. Das thrombozytenreiche Plasma bildet den Überstand und wird mittels einer Handpresse über ein Leukozyten-Filter in einen Vorratskontainer gepresst, wodurch gleichzeitig eine Leukozytendepletion erreicht wird. Der Vorratsbeutel mit dem gepoolten Thrombozytenkonzentrat wird dann steril mittels Blutbeutels-Schlauch-Schweißgeräts (TSCD-Gerätes) abgetrennt.

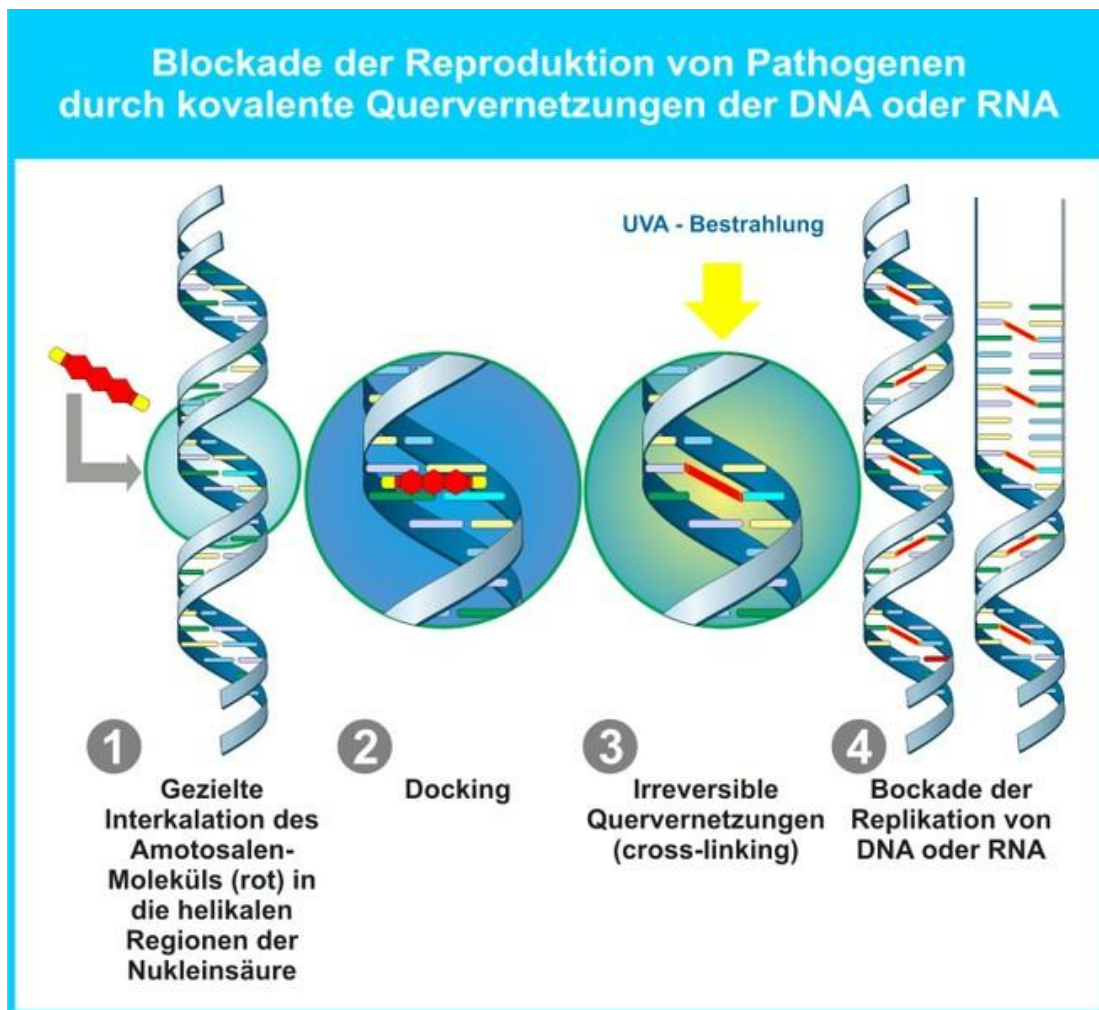
4.9. Pathogenreduktion mittels Intercept

Bei dem Intercept-Verfahren (INTERCEPT Blood System) der Firma CERUS handelt es sich um ein photochemisches Behandlungssystem. Das System basiert auf einer Helinx®-Technologie und der photochemischen Aktivierung von Amotosalen-HCl, das dem fertigen Thrombozytenkonzentrat zugesetzt wird. Amotosalen gehört zu den synthetisch hergestellten Psoralenen, das primär reversibel in die Helix der DNA und RNA interkaliert. Nach UVA-Bestrahlung im Illuminator (UVA) reagiert Amotosalen

mit den Pyrimidinbasen und bildet irreversible Quervernetzungen (cross-linking) mit Nukleinsäuren (95). Infolgedessen wird Genomreplikation blockiert (Abbildung 4) (96).

Diese Art der photochemischen Behandlung wirkt sich auf die Thrombozyten und deren Funktion nicht aus, da sie zu den kernlosen und ausdifferenzierten Zellen gehören (97).

Abbildung 4. Molekularer Wirkmechanismus von Amotosalen.



Das INTERCEPT-Verfahren mit Thrombozytenpräparaten umfasst folgende Schritte:

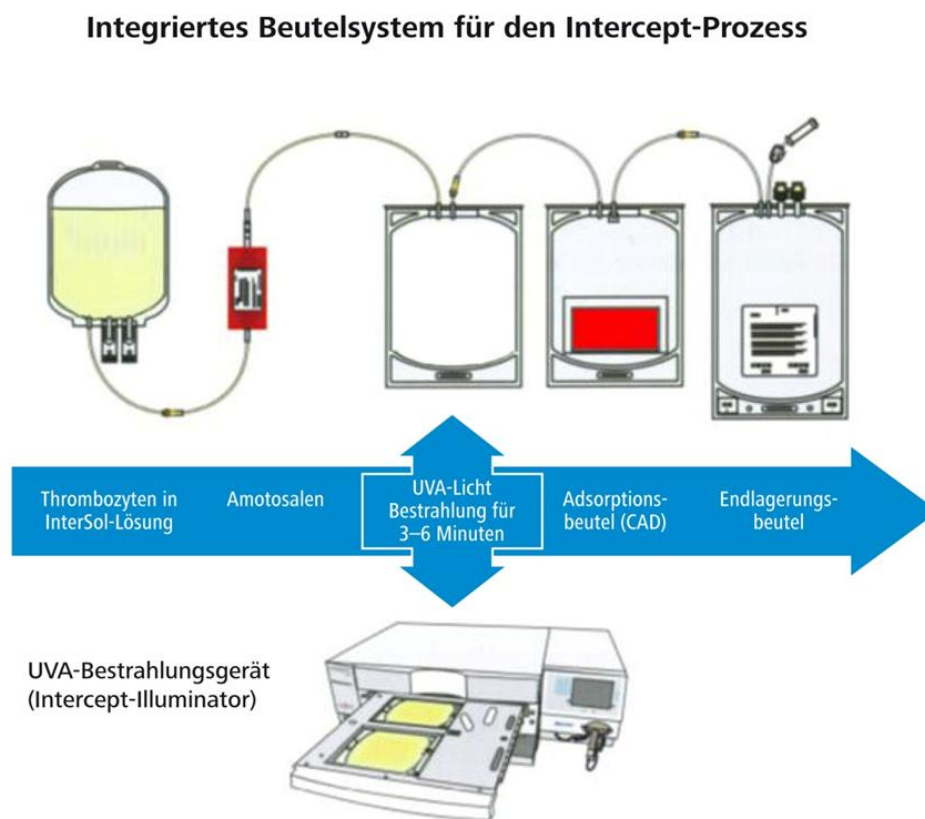
- Zugabe von Amotosalen zum Thrombozytenkonzentrat
- 3-6 minütige Bestrahlung mit UVA-Licht

→ Reduktion des freien Amotosalen über eine Adsorptionsmatrix (CAD)

→ Beendung der CAD-Phase (97; 98)

Dafür verwendet man ein aus vier Beuteln bestehendes INTERCEPT-Set: Amotosalen-Beutel, Bestrahlungsbeutel, Komponenten-Adsorptionsmatrix-Beutel (Compound Adsorption Device, CAD) und Endlagerungsbeutel (Abbildung 5) (99).

Abbildung 5. INTERCEPT-System und dessen Schritte.



4.9.1. Zugabe von Amotosalen

Das Thrombozytenkonzentrat wird mittels eines sterilen Schweißgerätes an den Amotosalen-Beutel des INTERCEPT-Sets angeschlossen. Nach Öffnung der Knickventile erst unterhalb (visuelle Überprüfung des Amotosalen-Gehaltes) und dann

oberhalb des Amotosalen-Beutels fließt das Thrombozytenkonzentrat unter Einwirkung der Schwerkraft über den Amotosalen-Beutel in den Bestrahlungsbeutel. Im nächsten Schritt werden die zwei ersten leeren Beutel mittels TSCD vom Set abgetrennt. Amotosalen-HCl ist in Kochsalz als 3 mMol Lösung vorhanden bei einem Nennvolumen von 17,5 ml. Damit die Wirksamkeit des INTERCEPT-Prozesses gewährleistet bleibt, ist eine Amotosalen-Konzentration zwischen 120 und 180 μM erforderlich. Nach Zugabe von 17,5 ml Amotosalen-Lösung zu beispielweise 282,5 ml Apherisat liegt das Endvolumen bei 300 ml und somit die Endkonzentration von Amotosalen HCl bei 175 μM (100).

4.9.2. UVA-Bestrahlung

Um einen potentiellen Amotosalen-Abbau durch UV-Licht zu vermeiden, muss die Bestrahlung nach der Zugabe von Amotosalen in das Thrombozytenkonzentrat unverzüglich durchgeführt werden. Das Produkt wird im INTERCEPT-Illuminator mit einer kontrollierten Dosis von 3,5-4,3 J/cm^2 UVA-Licht ca. 3-6 Minuten bestrahlt. Die Erzeugung der Strahlung erfolgt durch integrierte Fluoreszenz-Lampen und ein spezielles UV-Filterglas. Um die erforderliche Lichtdosierung zu erreichen wird die Bestrahlungsdauer entsprechend variiert und von einem Mikroprozessor und integrierten Lichtsensoren gesteuert. Durch die ständige Agitation des Blutproduktes während des Bestrahlungsvorgangs wird der gesamte Inhalt der gleichen UVA-Dosis ausgesetzt. Die Behandlung von Thrombozytenkonzentraten erfolgt gleichzeitig in den zwei unabhängigen Bestrahlungskammern (98).

4.9.3. CAD-Phase

Nach der UVA-Bestrahlung wird das Knickventil zwischen dem Bestrahlungsbeutel und dem CAD-Beutel geöffnet und das Thrombozytenpräparat schwerkraftbedingt in den CAD-Beutel transferiert. Nach manueller Entlüftung des CAD-Beutels in den Bestrahlungsbeutel erfolgt die Abtrennung des Letzten vom INTERCEPT-Set. Um eine Kontamination des Patienten mit Amotosalen und weiteren ungebundenen Photoderivaten zu verhindern, werden die Thrombozyten über 6 bis 16 Stunden unter ständiger Agitation im Adsorptionsbeutel zwischengelagert. Der im CAD-Beutel

befindliche Adsorptionswafer sorgt für Adsorption der oben genannten Substanzen. Nach der Beendigung der CAD-Phase wird das Thrombozytenkonzentrat in den Endlagerungsbeutel übergeleitet, wo es bei Raumtemperatur (ca. 20 +/- 2° C) unter ständiger Agitation bis zum Ende der Haltbarkeit gelagert wird (100).

4.10. Studien

4.10.1. Ablauf der Intercept-Pathogenreduktionsstudie für Vollblutpräparate

4.10.1.1. Sterilitätskontrolle der Vollblutpräparate

An das Blutentnahmebeutelsystem vom Fresenius oder Maco-Pharma wird ein Transferbeutel mittels TSCD-Geräts angeschweißt. Unter Laminar-flow-Bedingungen wird dann ein Adapter am Transferbeutel befestigt. Nach dreifacher Desinfektion der Adaptermembran erfolgt die Probenentnahme mittels einer Spritze mit Nadel. Mit dem gewonnenen Material werden die BacT/ALERT- Flaschen und Blutagarplatten beimpft (weiteres Vorgehen wie im Punkt 4.6 und 4.7). Nach der Materialgewinnung wird der Transferbeutel von den Vollblutpräparaten, die nicht beimpft werden sollen, mittels TSCD-Gerätes wieder abgetrennt.

4.10.1.2. Spiken der Vollblutpräparate mit Bakterien

Ein von den 5 Vollblutpräparaten wird über den Transferbeutel mit der gewünschten Keimkonzentration beimpft (siehe Punkt 4.4). Nach der Beimpfung erfolgt unter sterilen Bedingungen Materialgewinnung zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten. Die vier nicht gespikten Vollblutpräparate sowie das beimpfte Vollblutpräparat werden für 12h unter Raumtemperatur (ca. 20°C) gelagert.

4.10.1.3. Konzentrationskontrolle vor BC-

Herstellung

Nach der Mischung des geimpften Vollblutpräparates auf dem Agitator erfolgt unter sterilen Bedingungen Materialgewinnung zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT- Flaschen und Blutagarplatten. Danach werden die Vollblutpräparate zentrifugiert bei 3931 x g für 16 Minuten. Mittels eines automatisierten Geräts (Compomat) werden zellulären Bestandteilen des Bluts von Plasma abgetrennt. Diese Zellfraktion enthält Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten. Dabei bilden die Erythrozyten den untersten Teil des Sediments und können mit Hilfe des Compomats halbquantitativ von Thrombozyten und Leukozyten getrennt werden. Das verbliebene Material, das die Thrombozyten- und Leukozytenfraktion enthält, nennt man Buffy coat (BC).

4.10.1.4. Kontrolle der Keimkonzentration im BC

Aus dem BC-Präparat, das aus dem gespikten Vollblutpräparat gewonnen worden ist, wird unter Laminar-flow-Bedingungen eine Probe zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten gewonnen. Im nächsten Schritt werden 5 BCs gepoolt. Dazu werden zunächst ein beimpftes und vier nicht-beimpfte Buffy coats steril aneinander geschweißt und mit 200ml InterSol gemischt. Anschließend folgt eine Zentrifugation bei 340 x g für 9 Minuten und 40 Sekunden. Mittels einer Handpresse wird das thrombozytenreiche Plasma über ein Filter in einen Vorratskontainer gepresst. Mittels Leukozyten-Filter wird die Leukozytendepletion erreicht und das Thrombozytenkonzentrat bleibt zurück.

4.10.1.5. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-

TK

Aus dem hergestellten Pool-Thrombozytenkonzentrat wird unter sterilen Bedingungen eine Probe zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-

Flaschen und Blutagarplatten gewonnen. Thrombozytenkonzentrate werden unter ständiger Agitation bei 20°C +/- 2 °C gelagert.

4.10.1.6. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool- TK vor Inaktivierung

Nach 35,5h nach der Beimpfung des Vollblutpräparates mit gewähltem Keim erfolgt eine Probenentnahme aus dem Pool-Thrombozytenkonzentrat zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten. Die Zeit entspricht der maximalen Zeit, die in einer Zulassungsstudie für den DRK Baden-Württemberg – Hessen GmbH vom Regierungspräsidium Darmstadt und dem Paul-Ehrlich-Institut (Bundesoberbehörde) genehmigt wurde. Auch wenn unter Routinebedingungen diese maximale Zeit nicht immer benötigt wird, und somit die Pathogenreduktionsmaßnahme zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt werden kann, wurde bewusst in der vorliegenden experimentellen Arbeit ein maximaler Zeitraum gewählt, der in Übereinstimmung mit der Spezifikation des Blutspendedienstes liegt. Anschließend wird das Pathogeninaktivierungssystem „Intercept Blood System“ mittels TSCD-Geräts an das Thrombozytenkonzentrat angeschweißt. Nach der UVA-Bestrahlung im Illuminator wird Amotosalen aktiviert.

4.10.1.7. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool- TK vor der CAD-Phase

Nach dem Entlüften des Adsorptionsbeutels mittels Handpresse wird der Bestrahlungsbeutel vom restlichen Intercept-Set mittels TSDC-Geräts abgetrennt. Im Bestrahlungsbeutel werden ca. 20ml Thrombozytenlösung belassen. Durch Anschweißen eines Transfersbeutels an den Bestrahlungsbeutel kann eine Probe zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten steril gewonnen werden.

4.10.1.8. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-

TK nach der CAD-Phase

Nach 6-16h wird die CAD-Phase beendet, indem man die Thrombozytenlösung aus dem Adsorptionsbeutel in Endlagerungsbeutel überleitet. Entlüften des Thrombozytenpräparates mit Hilfe einer Handpresse. Der Adsorptionsbeutel wird mittels TSCD-Geräts abgetrennt. Aus dem Endlagerungsbeutel wird eine Probe zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten steril gewonnen.

4.10.1.9. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-

TK am 5.Tag nach der Pathogenreduktion

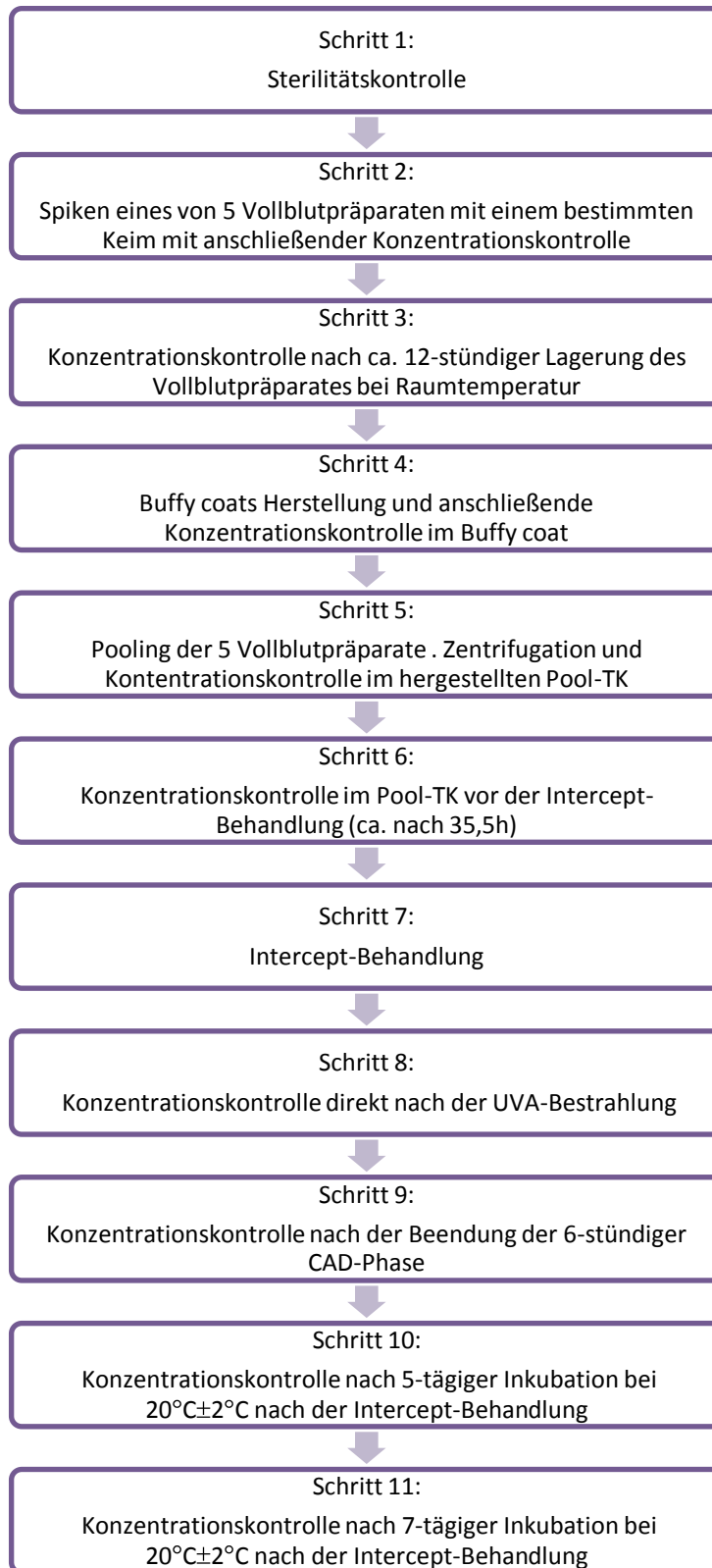
Am 5. Tag nach der Pathogenreduktionsmaßnahme wird aus dem Endlagerungsbeutel eine Probe zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten steril gewonnen.

4.10.1.10. Kontrolle der Keimkonzentration im Pool-

TK am 7.Tag nach der Pathogenreduktion

Am 7. Tag nach der Pathogenreduktionsmaßnahme wird aus dem Endlagerungsbeutel eine Probe zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten steril gewonnen.

Abbildung 6. Schematische Darstellung des Studienverlaufs für Vollblutpräparate.



4.10.2. Ablauf der Intercept-Pathogenreduktionsstudie für Pool-/ oder Apherese-Thrombozytenkonzentrate

4.10.2.1. Sterilitätskontrolle der TKs

Unter Laminar-flow-Bedingungen wird ein Adapter am Thrombozyten-Beutel befestigt. Nach dreifacher Desinfektion der Adaptermembran wird eine Probe mittels einer Spritze mit Nadel entnommen. Anschließend erfolgt die Beimpfung der BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten mit gewonnenem Material.

4.10.2.2. Spiken der TKs mit Bakterien

Ein Thrombozytenpräparat wird mit der gewünschten Keimkonzentration beimpft. Unter sterilen Bedingungen wird dann die gewonnene Probe zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten verwendet. Das gespikte Thrombozytenpräparat wird für die nächsten 12h unter Raumtemperatur (ca. 20°C+/-2°C) unter ständiger Agitation gelagert.

4.10.2.3. Kontrolle der Keimkonzentration im TK vor Inaktivierung

Circa 12h nach der Beimpfung des Thrombozytenpräparates mit gewähltem Keim erfolgt eine Materialgewinnung aus dem Thrombozytenkonzentrat zur Keimdetektion und Konzentrationskontrolle mittels BacT/ALERT-Flaschen und Blutagarplatten. Anschließend wird das Pathogenreduktionssystem „Intercept Blood System“ mittels TSCD-Geräts an das Thrombozytenkonzentrat angeschlossen (siehe Punkt 4.9.1 und 4.9.2).

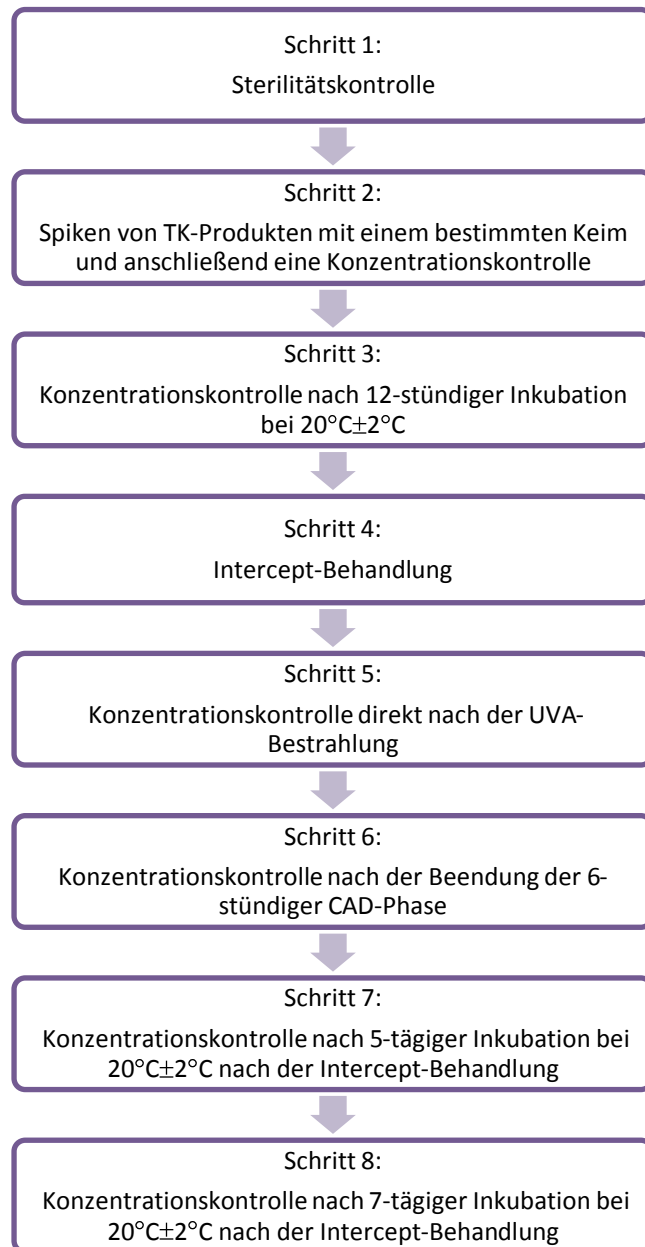
4.10.2.4. Kontrolle der Keimkonzentration im TK vor der CAD-Phase (siehe Punkt 4.10.1.7).

4.10.2.5. Kontrolle der Keimkonzentration im TK nach der CAD-Phase (siehe Punkt 4.10.1.8).

4.10.2.6. Kontrolle der Keimkonzentration im TK am 5.Tag nach der Pathogenreduktion (siehe Punkt 4.10.1.9).

4.10.2.7. Kontrolle der Keimkonzentration im TK am 7.Tag nach der Pathogenreduktion (siehe Punkt 4.10.1.10).

Abbildung 7. Schematische Darstellung des Studienverlaufs für Thrombozytenpräparate.



5. Ergebnisse

5.1. Phase 1: Wachstumskinetik von Bakterien in Thrombozytenkonzentraten

Pool-TKs wurden pro Bakterienstamm mit 100 Keimen/ml (CFU/ml) gespikt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 72h alle 6 h eine Probe (2ml) unter sterilen Bedingungen entnommen und in verschiedenen Verdünnungen auf Blutagarplatten ausplattiert, die anschließend für weitere 24h bei 37°C gelagert wurden. Für jedes Bakterium wurde die Wachstumskinetik in drei voneinander unabhängigen Experimenten untersucht. Die drei unabhängigen Experimente sind durch verschiedene Strichlinien in den Abbildungen 8 – 15 dargestellt.

Abbildung 8. Wachstumskinetik *Bacillus cereus* in Thrombozytenkonzentraten.

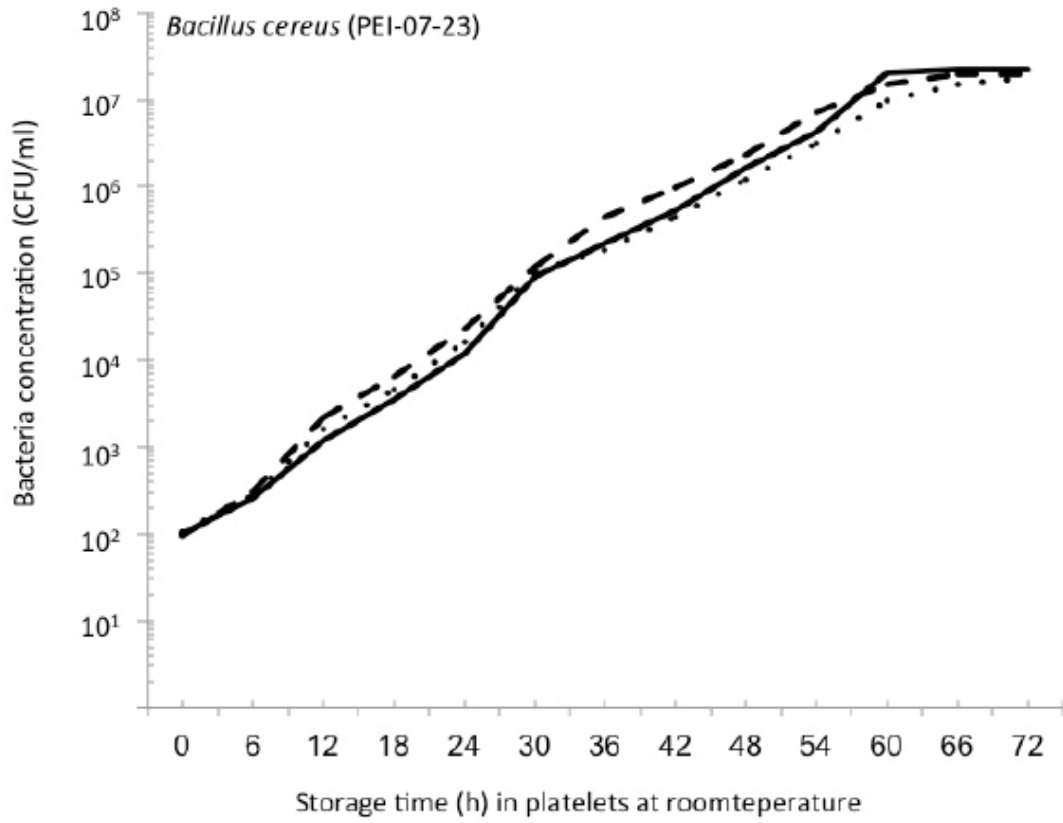


Abbildung 9. Wachstumskinetik *Klebsiella pneumoniae* 01 in Thrombozytenkonzentraten.

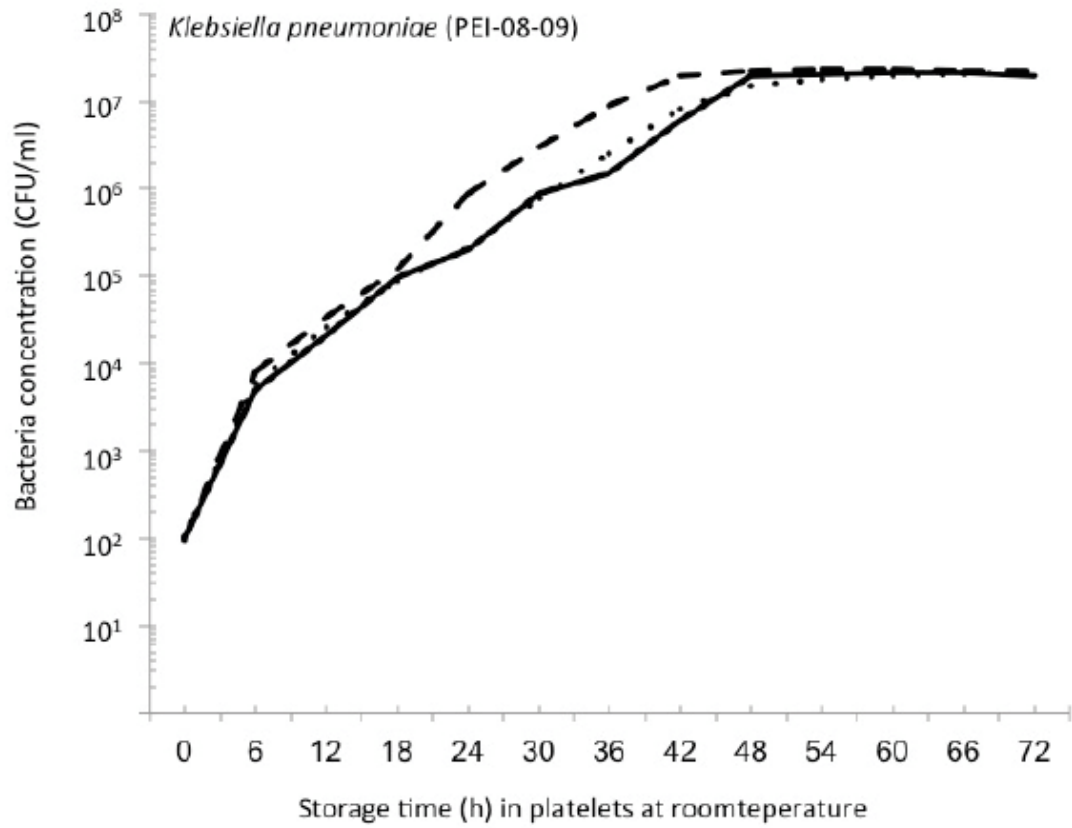


Abbildung 10. Wachstumskinetik *Klebsiella pneumoniae* 02 in Thrombozytenkonzentraten.

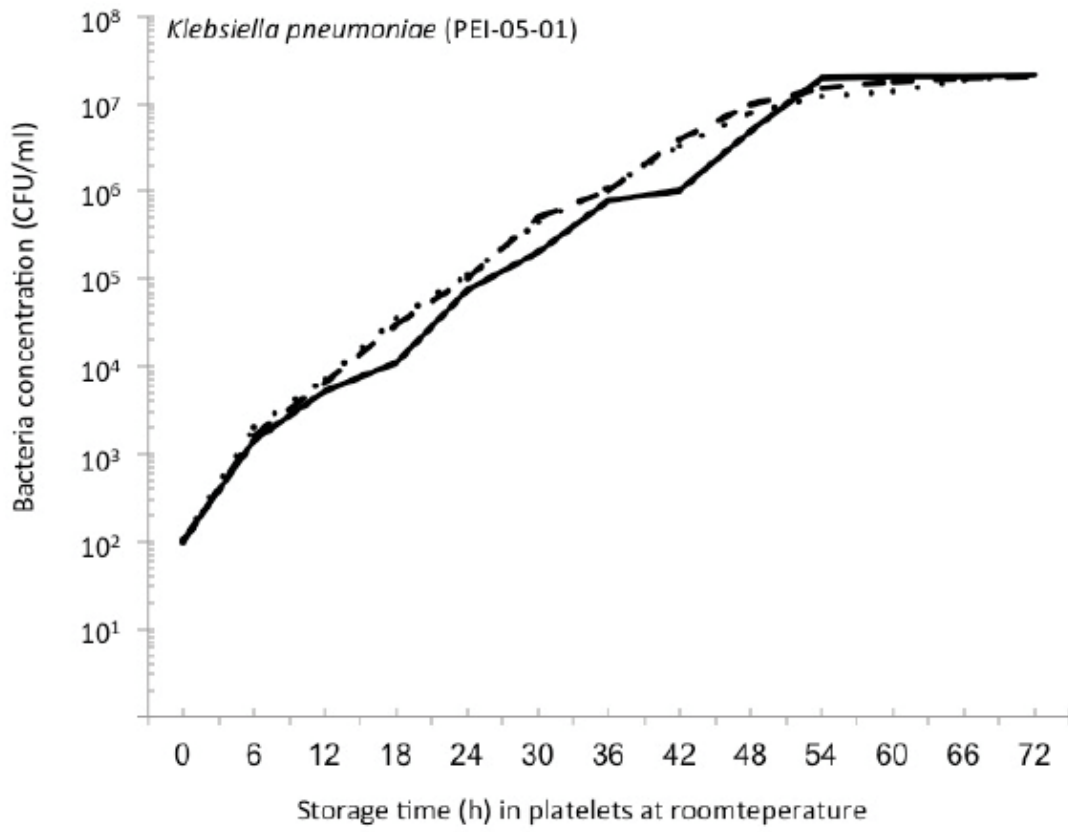


Abbildung 11. Wachstumskinetik *Serratia marcescens* in Thrombozytenkonzentraten.

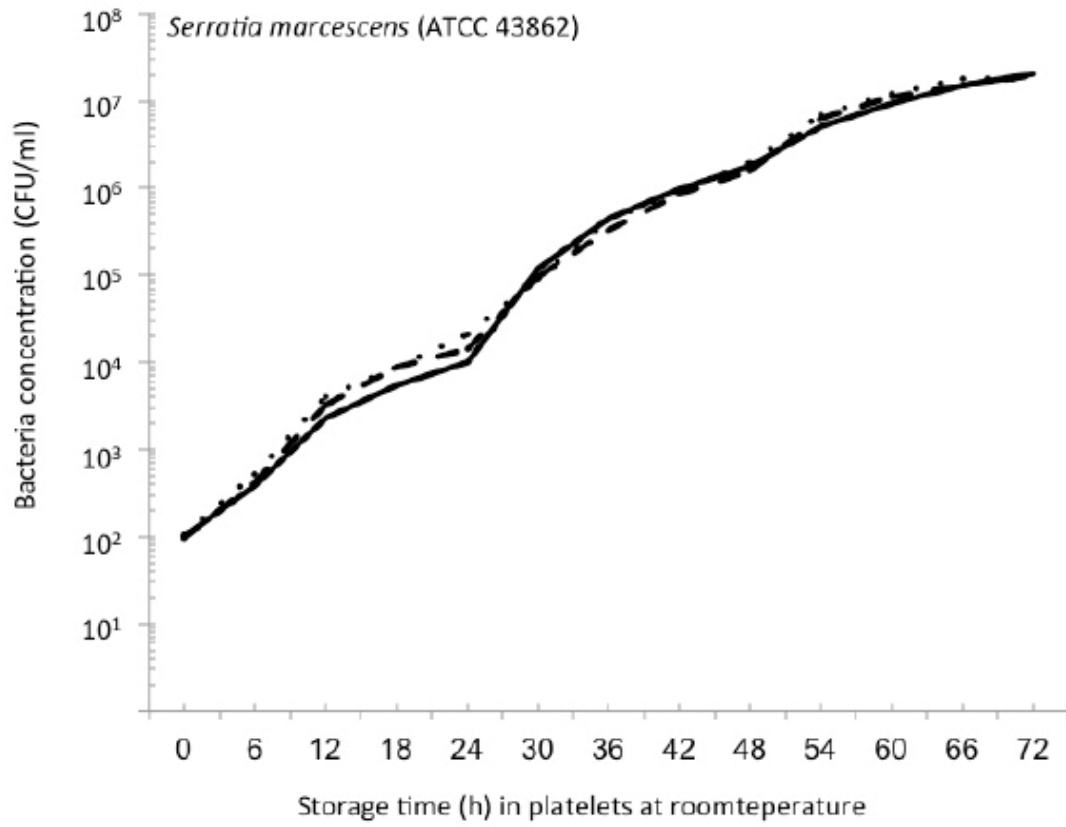


Abbildung 12. Wachstumskinetik *Staphylococcus epidermidis* in Thrombozytenkonzentraten.

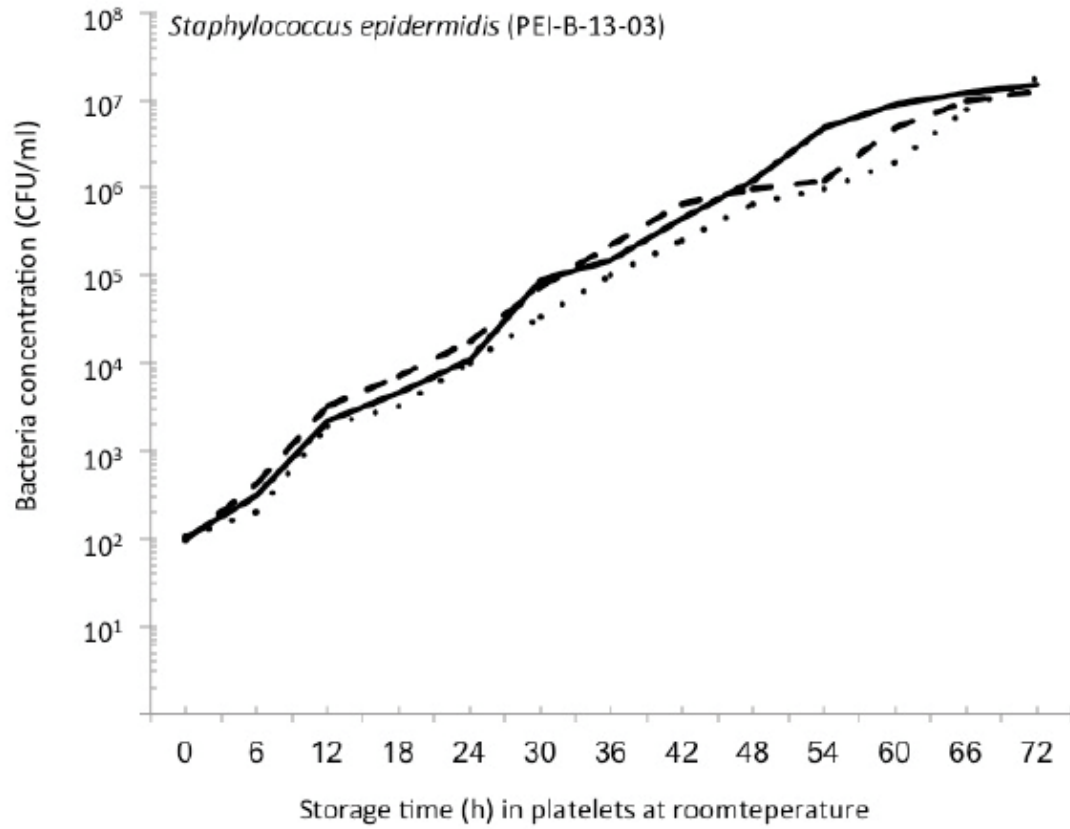


Abbildung 13. Wachstumskinetik *Staphylococcus aureus* in Thrombozytenkonzentraten.

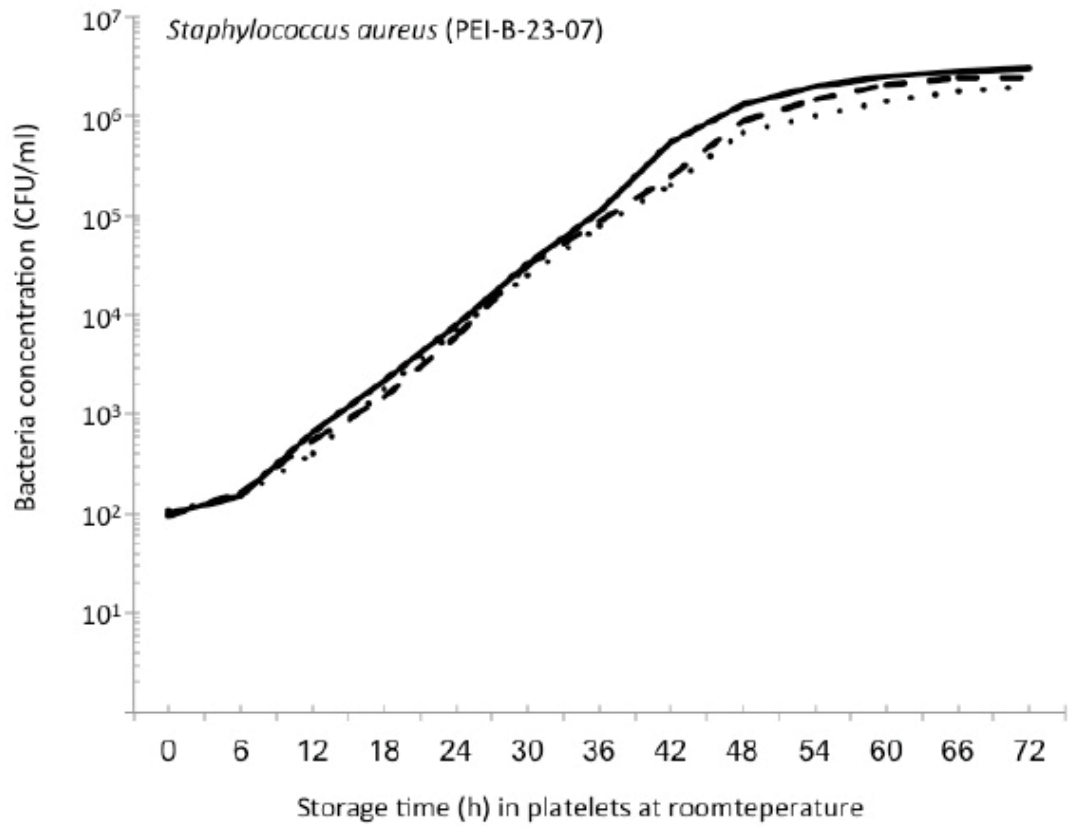


Abbildung 14. Wachstumskinetik *Streptococcus pyogenes* in Thrombozytenkonzentraten.

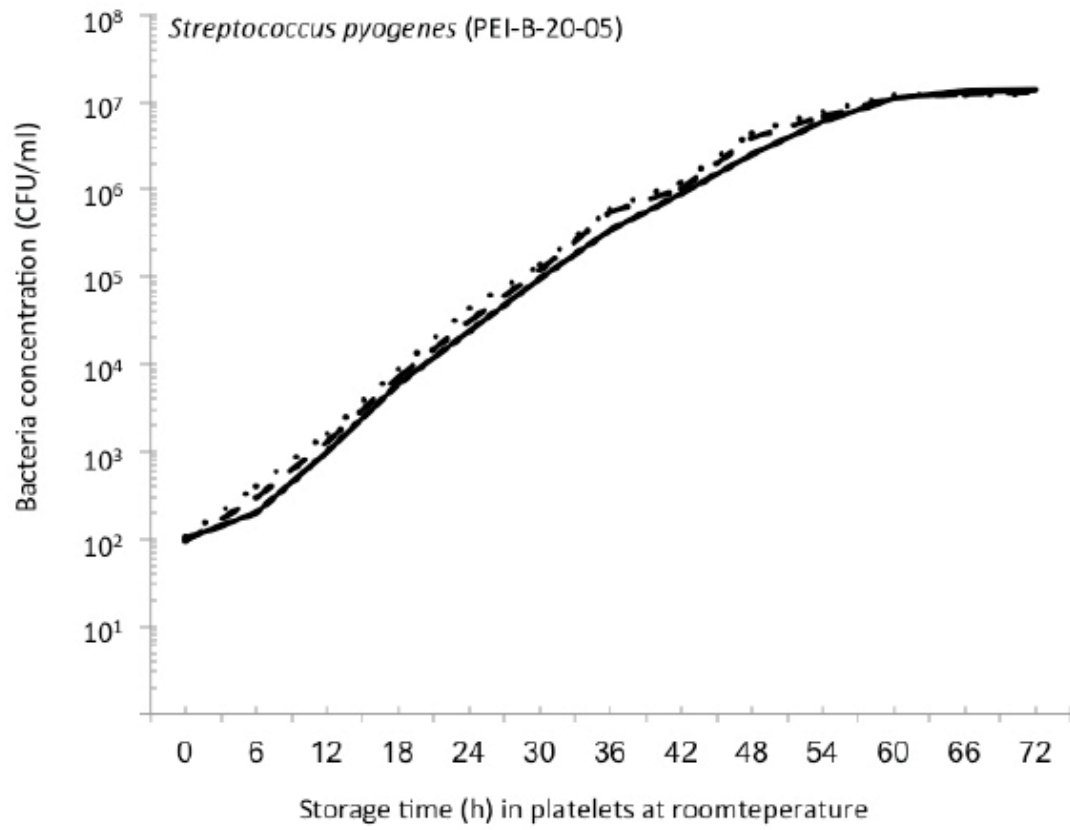
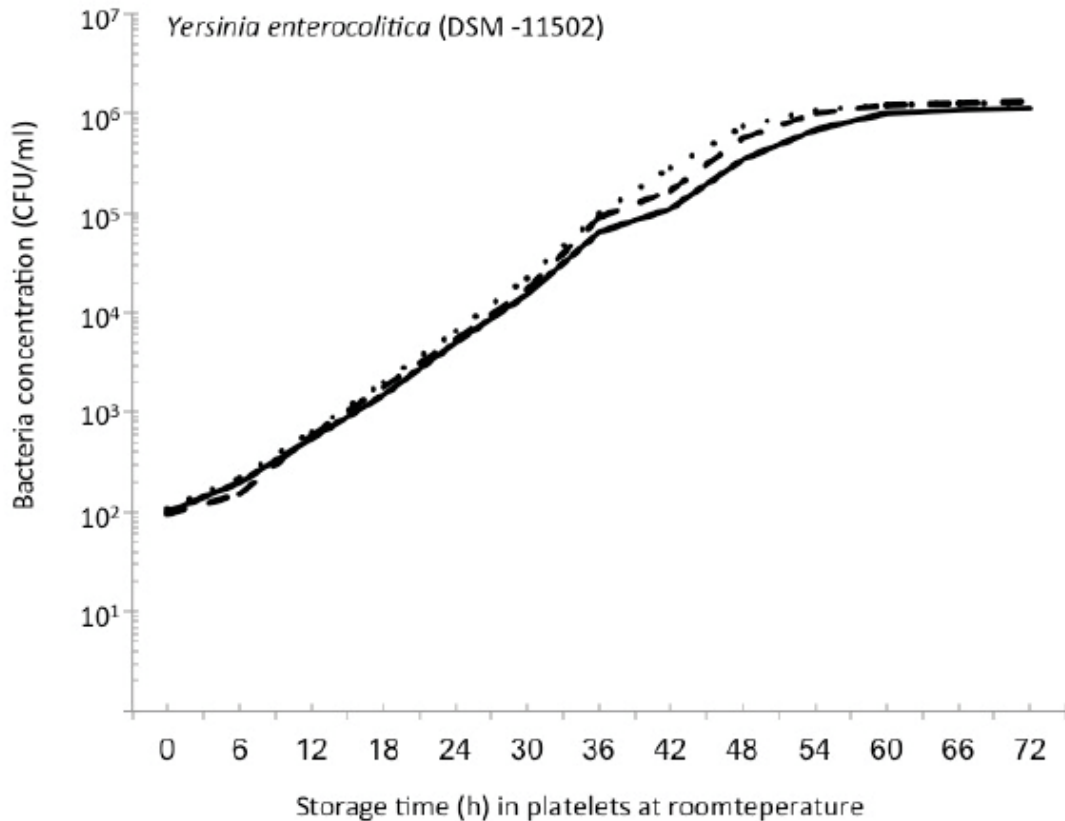


Abbildung 15. Wachstumskinetik *Yersinia enterocolitica* in Thrombozytenkonzentraten.



Alle Wachstumskinetiken in den Abbildungen 8 bis 15 zeigen, dass die ausgewählten Bakterienstämme in Thrombozytenkonzentraten unter normalen Lagerbedingungen (Agitation bei $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) über ein intensives Wachstum verfügen und sich somit für die weiteren Experimente eignen, um die klinische Effizienz eines Pathogeninaktivierungsverfahrens zu evaluieren.

5.2. Phase 2: Vollblutexperimente

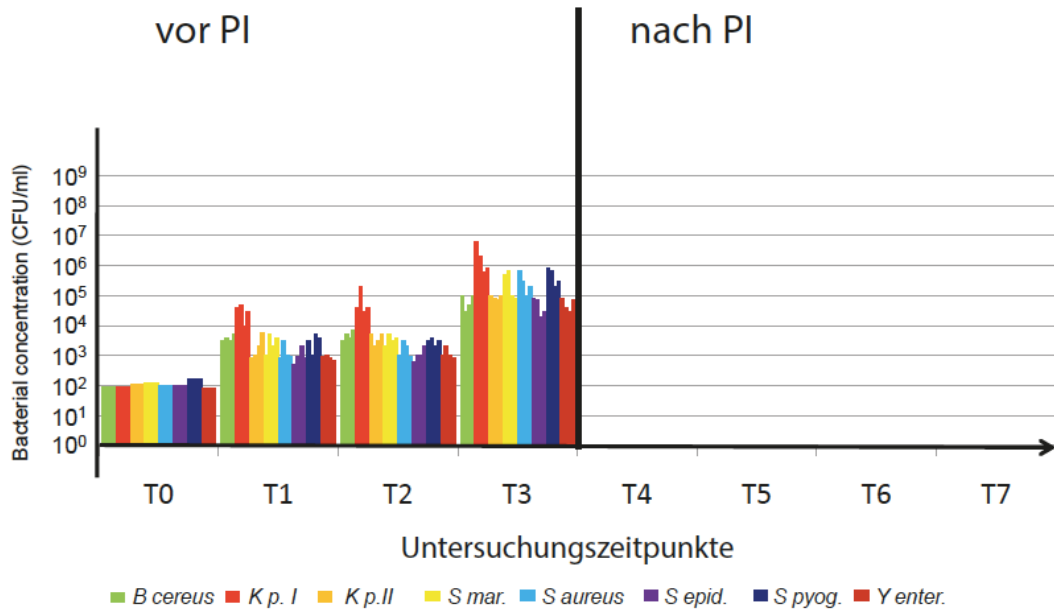
Für diese Experimente wurden Vollblutkonserven verwendet und mit den unter Punkt 5.1 aufgeführten Bakterienstämmen in zwei verschiedenen Konzentrationen (A: 100 CFU/ Beutel; B: 1000 CFU/Beutel) gespikt. Für die Herstellung der Pool-TKs aus den Vollblutprodukten wurde im Mittel eine Zeit von 15,5 Stunden benötigt. Anschließend

wurden die hergestellten Pool-TKs für 20h bei Raumtemperatur unter ständiger Agitation aufbewahrt, um die maximal zulässige Zeit gemäß der Zulassung des DRK Baden-Württemberg-Hessen zu verwenden. Für jedes Bakterium wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Für die Experimente sind die Untersuchungszeiten in der Tabelle 6 definiert.

Tabelle 6. Untersuchungszeiträume für Vollblutexperimente.

Zeitpunkt	Definition	Zeit vom Startpunkt (h)
T0	Start des Experiments	0
T1	Ende Buffy – coat – Produktion	15
T2	Ende Pool – TK – Herstellung	15,5
T3	Vor Pathogeninaktivierung	35,5
T4	Nach Pathogeninaktivierung	36,5
T5	Nach CAD – Phase	42,5
T6	Ende Tag 5 nach Spiken	120
T7	Ende Tag 7 nach Spiken	168

Abbildung 16. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Vollblutprodukte mit 100 CFU/Beutel.



Die Abbildung 16 zeigt, dass alle 8 Bakterienstämme in allen Experimenten komplett inaktiviert wurden, da zu den Untersuchungszeiträumen T4, T5, T6 und T7 keine Bakterien nachgewiesen werden konnten.

Die Tabelle 7 zeigt für jedes Bakterium die mittlere Konzentration, die minimale Konzentration, die maximale Konzentration, sowie die Standardabweichung.

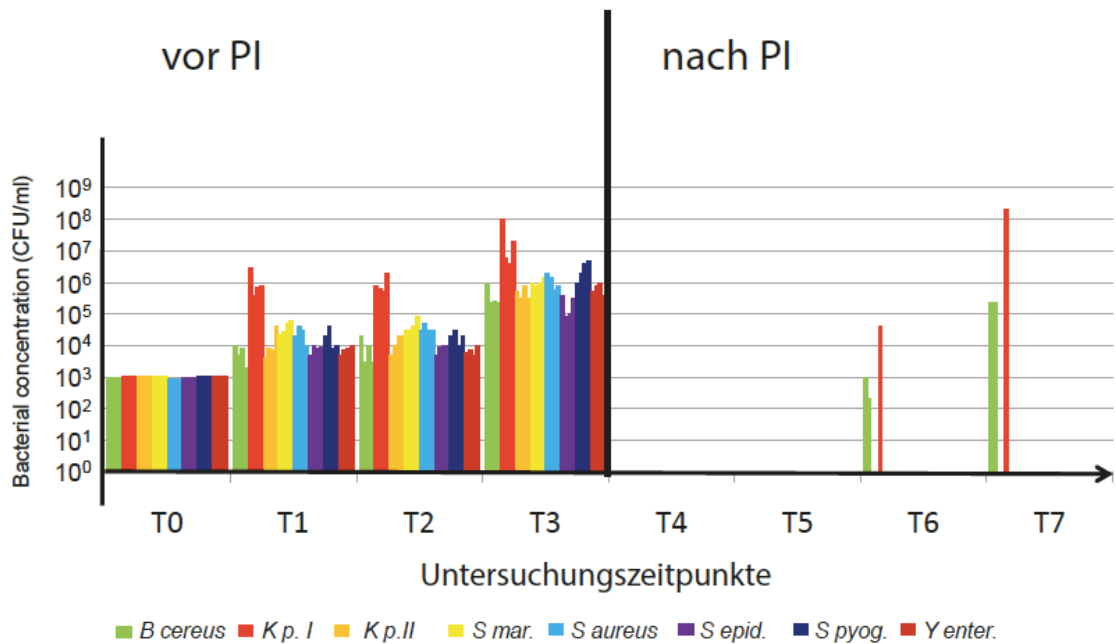
Tabelle 7. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Vollblutprodukte mit 100 CFU/Beutel gespikt wurden.

		TO (CFU/ml)	Vor PI (CFU/ml)	Tag 5 (CFU/ml)	Tag 7 (CFU/ml)
<i>B.cereus</i> (PEI-B-07-23)	Mittelwert	89	7,00E+04	0	0
	Minimum	89	3,00E+04	0	0
	Maximum	89	1,00E+05	0	0
	SD		35590,26		
	VC %		50,84		
<i>K.pneumoniae I</i> (PEI-B-08-09)	Mittelwert	94	2,35E+06	0	0
	Minimum	94	6,00E+05	0	0
	Maximum	94	6,00E+06	0	0
	SD		2510644,01		
	VC %		106,84		
<i>K.pneumoniae II</i> (PEI-B-05-01)	Mittelwert	108	8,75E+04	0	0
	Minimum	108	7,00E+04	0	0
	Maximum	108	1,00E+05	0	0
	SD		15000		
	VC %		17,14		
<i>S.marcescens</i> (ATCC 43862)	Mittelwert	117	3,45E+05	0	0
	Minimum	117	8,00E+04	0	0
	Maximum	117	7,00E+05	0	0
	SD		3,06E+05		
	VC %		88,6		
<i>S.aureus</i> (PEI-B-23-07)	Mittelwert	96	3,25E+05	0	0
	Minimum	96	1,00E+05	0	0
	Maximum	96	7,00E+05	0	0
	SD		262995,564		
	VC %		80,92		
<i>S.epidermidis</i> (PEI-B-13-03)	Mittelwert	103	5,00E+04	0	0
	Minimum	103	2,00E+04	0	0
	Maximum	103	8,00E+04	0	0
	SD		29439,20289		
	VC %		58,88		
<i>S.pyogenes</i> (PEI-B-20-05)	Mittelwert	167	5,00E+05	0	0
	Minimum	167	2,00E+05	0	0
	Maximum	167	8,00E+05	0	0
	SD		294392,0289		
	VC %		58,88		
<i>Y.enterocolitica</i> (DSM 11502)	Mittelwert	84	5,50E+04	0	0
	Minimum	84	3,00E+04	0	0
	Maximum	84	8,00E+04	0	0
	SD		23804,76143		
	VC %		43,28		

Obgleich, wie in Tabelle 7 dargestellt betrug die maximale Bakterienkonzentration in einem Experiment für den Keim *Klebsiella pneumoniae* (PEI-B-08-09) 6×10^6 CFU/ml vor Pathogeninaktivierung, erfolgte eine komplette Inaktivierung mit dem Intercept-Verfahren.

In den nächsten Experimenten wurde die Spikingkonzentration von 100 CFU/Beutel auf 1000 CFU/Beutel erhöht. Die Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Pathogeninaktivierung dieser Experimente.

Abbildung 17. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Vollblutprodukte mit 1000 CFU/Beutel.



Die Abbildung 17 zeigt, dass alle 6 Bakterienstämme in allen Experimenten komplett inaktiviert wurden, da zu dem Untersuchungszeitpunkt T4, T5, T6 und T7 keine Bakterien nachgewiesen werden konnten. Beim Keim *Bacillus cereus* sind zum Zeitpunkt T6 und T7 (120 Stunden nach dem Spiken und 168 Stunden nach dem Spiken) in 2/4 Präparaten Bakterien nachweisbar. Somit betrug die Inaktivierungseffizienz für diesen Keim 50%. Beim Keim *Klebsiella pneumoniae* I

(PEI-B-08-09) konnte der Keim zum Zeitpunkt T6 und T7 in 1/4 Präparaten nachgewiesen werden. Somit betrug die Inaktivierungseffizienz für diesen Keim 75%.

Die Tabellen 8 – 9 zeigen für jedes Bakterium die mittlere Konzentration, die minimale Konzentration, die maximale Konzentration, sowie die Standardabweichung.

Tabelle 8. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Vollblutprodukte mit 1000 CFU/Beutel gespikt wurden.

		TO (CFU/ml)	Vor PI (CFU/ml)	Tag 5 (CFU/ml)	Tag 7 (CFU/ml)
<i>B.cereus</i> (PEI-B-07-23)	Mittelwert	981	4,25E+05	305	1,15E+05
	Minimum	981	2,20E+05	0	0
	Maximum	981	1,00E+06	1,00E+03	2,40E+05
	SD		383796,82	474,8	133041,35
	VC %		90,31	155,67	115,69
<i>K.pneumoniae I</i> (PEI-B-08-09)	Mittelwert	1104	3,25E+07	1,00E+04	5,00E+07
	Minimum	1104	4,00E+06	0	0
	Maximum	1104	1,00E+08	4,00E+04	2,00E+08
	SD		45559484,93	2,00E+04	1,00E+08
	VC %		140,18	200	200
<i>K.pneumoniae II</i> (PEI-B-05-01)	Mittelwert	1044	4,75E+05	0	0
	Minimum	1044	3,00E+05	0	0
	Maximum	1044	8,00E+05	0	0
	SD		236290,7813		
	VC %		49,75		
<i>S.marcescens</i> (ATCC 43862)	Mittelwert	1087	1,03E+06	0	0
	Minimum	1087	8,00E+05	0	0
	Maximum	1087	1,40E+06	0	0
	SD		2,63E+05		
	VC %		25,66		
<i>S.aureus</i> (PEI-B-23-07)	Mittelwert	891	1,19E+06	0	0
	Minimum	891	5,70E+05	0	0
	Maximum	891	2,00E+06	0	0
	SD		642047,506		
	VC %		53,84		
<i>S.epidermidis</i> (PEI-B-13-03)	Mittelwert	955	2,20E+05	0	0
	Minimum	955	8,00E+04	0	0
	Maximum	955	4,00E+05	0	0
	SD		155777,6193		
	VC %		70,81		
<i>S.pyogenes</i> (PEI-B-20-05)	Mittelwert	1045	3,00E+06	0	0
	Minimum	1045	1,00E+06	0	0
	Maximum	1045	5,00E+06	0	0
	SD		1825741,858		
	VC %		60,86		
<i>Y.enterocolitica</i> (DSM 11502)	Mittelwert	1037	6,50E+05	0	0
	Minimum	1037	4,00E+05	0	0
	Maximum	1037	9,00E+05	0	0
	SD		238047,6143		
	VC %		36,62		

Die Tabelle 9 zeigt die Rohdaten aus den 4 Experimenten für die Keime *Bacillus cereus* und *Klebsiella pneumoniae I*, bei denen keine komplette Pathogeninaktivierung erfolgte.

Tabelle 9. Rohdaten für *Bacillus cereus* und *Klebsiella pneumoniae I* in mit 1000 CFU/Beutel gespikten Vollblutpräparaten.

	Experimente	T0 (CFU/ml)	Vor PI (CFU/ml)	Tag 5 (CFU/ml)	Tag 7 (CFU/ml)
<i>B.cereus</i> (PEI-B-07-23)	1	981	1,00E+06	1,00E+03	2,20E+05
	2	981	2,20E+05	2,20E+02	2,40E+05
	3	981	2,60E+05	0	0
	4	981	2,20E+05	0	0
<i>K.pneumoniae I</i> (PEI-B-08-09)	1	1104	1,00E+08	4,00E+04	2,00E+08
	2	1104	6,00E+06	0,00E+00	0,00E+00
	3	1104	4,00E+06	0,00E+00	0,00E+00
	4	1104	2,00E+07	0,00E+00	0,00E+00

Aus der Tabelle 9 ist erkennbar, dass die Bakterienkonzentration für *Klebsiella pneumoniae* im Fall der ineffizienten Pathogeninaktivierung 1×10^8 CFU/ml betrug. Dabei hat die Bakterienkonzentration die Inaktivierungskapazität des Verfahrens überschritten. Die fehlende komplette Inaktivierung bei dem Stamm *Bacillus cereus* lässt sich dadurch erklären, dass das Bakterium sowohl in seiner vegetativen Form, aber auch in seiner sporoiden Form gespikt wurde und das Intercept – Reagenz von Sporen nur ungenügend aufgenommen wird.

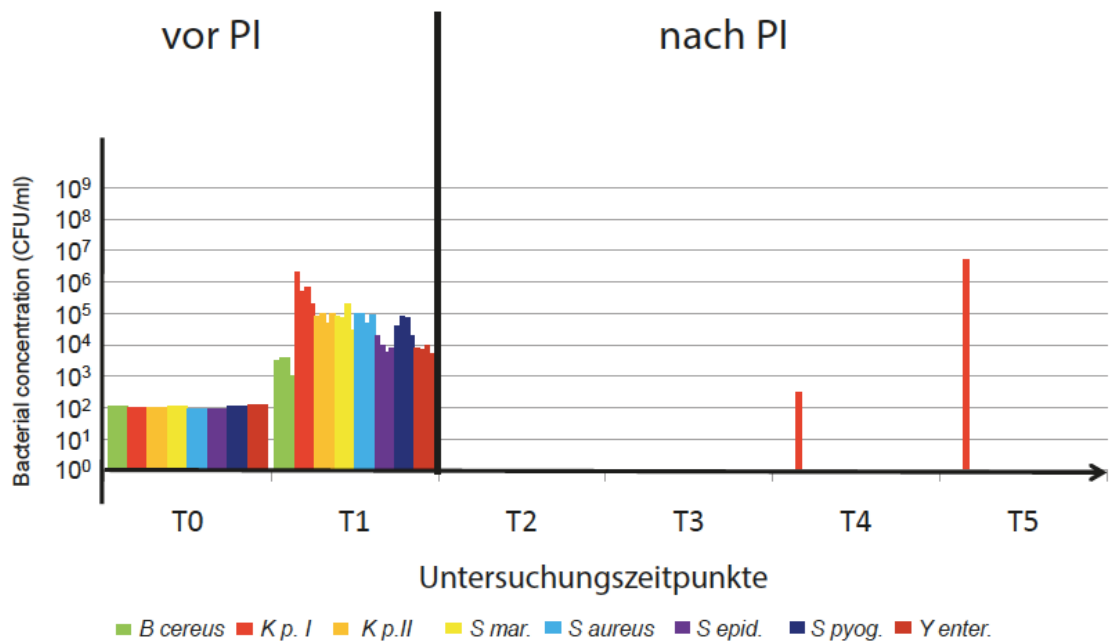
5.3. Phase 3: Experimente an Pool-TKs

Für diese Experimente wurden bereits fertige Pool-TKs verwendet und mit den unter Punkt 5.1 aufgeführten Bakterienstämmen in zwei verschiedenen Konzentrationen (A: 100 CFU/ Beutel; B: 1000 CFU/Beutel) gespikt. Der Zeitraum zwischen dem Spiken und der Inaktivierung betrug für diese Experimente 12 Stunden. Für jedes Bakterium wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Für die Experimente sind die Untersuchungszeiten in Tabelle 10 definiert.

Tabelle 10. Untersuchungszeiträume für Pool-TK-Experimente.

Zeitpunkt	Definition	Zeit vom Startpunkt (h)
T0	Start des Experiments	0
T1	Vor Pathogeninaktivierung	12
T2	Nach Pathogeninaktivierung	13
T3	Nach CAD – Phase	19
T4	Ende Tag 5 nach Spiken	120
T5	Ende Tag 7 nach Spiken	168

Abbildung 18. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Pool-TKs mit 100 CFU/Beutel.



Die Abbildung 18 zeigt, dass alle 7 Bakterienstämme in sämtlichen Experimenten komplett inaktiviert wurden, da zu den Untersuchungszeiträumen T4, T5, T6 und T7

keine Bakterien nachgewiesen werden konnten. Beim Bakterium *Klebsiella pneumoniae* (PEI-B-08-09) erfolgte die Inaktivierung nur in 3/4 Experimenten.

Die Tabelle 11 zeigt für jedes Bakterium die mittlere Konzentration, die minimale Konzentration, die maximale Konzentration, sowie die Standardabweichung.

Tabelle 11. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Pool-TKs mit 100 CFU/Beutel gespikt wurden.

		TO (CFU/ml)	Vor PI (CFU/ml)	Tag 5 (CFU/ml)	Tag 7 (CFU/ml)
<i>B.cereus</i> (PEI-B-07-23)	Mittelwert	112	3,00E+03	0	0,00E+00
	Minimum	112	1,00E+03	0	0
	Maximum	112	4,00E+03	0,00E+00	0,00E+00
	SD		1414,21		
	VC %		47,14		
<i>K.pneumoniae I</i> (PEI-B-08-09)	Mittelwert	96	8,50E+05	3,00E+02	5,00E+06
	Minimum	96	2,00E+05	3,00E+02	5,00E+06
	Maximum	96	2,00E+06	3,00E+02	5,00E+06
	SD		793725,39	1,50E+02	2,50E+06
	VC %		93,38	50	50
<i>K.pneumoniae II</i> (PEI-B-05-01)	Mittelwert	104	8,25E+04	0	0
	Minimum	104	5,00E+04	0	0
	Maximum	104	1,00E+05	0	0
	SD		23629,07813		
	VC %		28,64		
<i>S.marcescens</i> (ATCC 43862)	Mittelwert	116	9,50E+04	0	0
	Minimum	116	3,00E+04	0	0
	Maximum	116	2,00E+05	0	0
	SD		7,33E+04		
	VC %		77,11		
<i>S.aureus</i> (PEI-B-23-07)	Mittelwert	88	8,50E+04	0	0
	Minimum	88	5,00E+04	0	0
	Maximum	88	1,00E+05	0	0
	SD		23804,76143		
	VC %		28,01		
<i>S.epidermidis</i> (PEI-B-13-03)	Mittelwert	92	1,10E+04	0	0
	Minimum	92	6,00E+03	0	0
	Maximum	92	2,00E+04	0	0
	SD		6218,252702		
	VC %		56,53		
<i>S.pyogenes</i> (PEI-B-20-05)	Mittelwert	106	5,25E+04	0	0
	Minimum	106	2,00E+04	0	0
	Maximum	106	8,00E+04	0	0
	SD		27537,85274		
	VC %		52,45		
<i>Y.enterocolitica</i> (DSM 11502)	Mittelwert	121	7,50E+03	0	0
	Minimum	121	5,00E+03	0	0
	Maximum	121	1,00E+04	0	0
	SD		2081,665999		
	VC %		27,76		

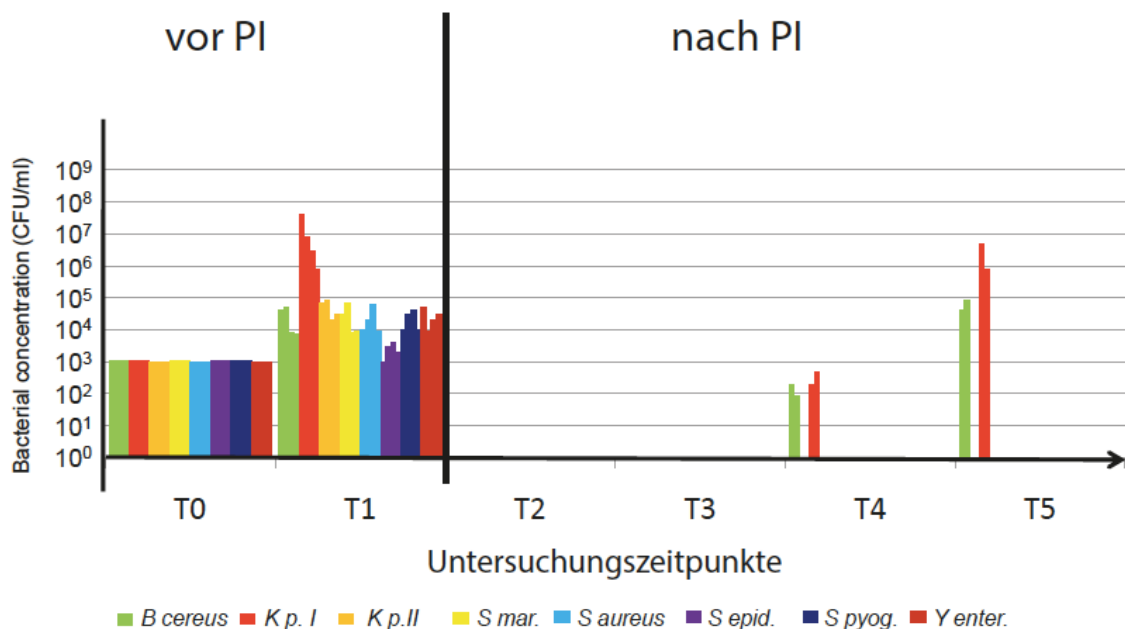
Tabelle 12. Rohdaten für *Klebsiella pneumoniae* I aus allen 4 Experimenten.

	Experimente	T0 (CFU/ml)	Vor PI (CFU/ml)	Tag 5 (CFU/ml)	Tag 7 (CFU/ml)
<i>K.pneumoniae</i> I (PEI-B-08-09)	1	96	2,00E+06	3,00E+02	5,00E+06
	2	96	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
	3	96	7,00E+05	0	0
	4	96	2,00E+05	0	0

In einem Experiment betrug die Bakterienkonzentration vor der Pathogeninaktivierung 2×10^6 CFU/ml. Diese hohe Bakterienkonzentration konnte durch das Intercept – Verfahren nicht inaktiviert werden.

In nächsten Experimenten wurde die Spikingkonzentration von 100 CFU/Beutel auf 1000 CFU/Beutel erhöht. Die Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Pathogeninaktivierung dieser Experimente.

Abbildung 19. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Pool-TKs mit 1000 CFU/Beutel.



Die Abbildung 19 zeigt, dass 6 Bakterienstämme in allen Experimenten komplett inaktiviert wurden, da zu den Untersuchungszeiträumen T2, T3, T4 und T5 keine

Bakterien nachgewiesen werden konnten. Beim Keim *Bacillus cereus* sind zum Zeitpunkt T4 und T5 (120 Stunden nach dem Spiken und 168 Stunden nach dem Spiken) in 2/4 Pool-TKs Bakterien nachzuweisen. Somit betrug die Inaktivierungseffizienz für diesen Keim 50%. Beim Keim *Klebsiella pneumoniae* I (PEI-B-08-09) konnte der Keim zum Zeitpunkt T4 und T5 in 2/4 Pool-TKs nachgewiesen werden. Somit betrug die Inaktivierungseffizienz für diesen Keim ebenfalls 50%.

Die Tabelle 13 zeigt für jedes Bakterium die mittlere Konzentration, die minimale Konzentration, die maximale Konzentration, sowie die Standardabweichung.

Tabelle 13. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Pool-TKs mit 1000 CFU/Beutel gespikt wurden.

		TO (CFU/ml)	Vor PI (CFU/ml)	Tag 5 (CFU/ml)	Tag 7 (CFU/ml)
<i>B.cereus</i> (PEI-B-07-23)	Mittelwert	1045	2,63E+04	72,5	3,00E+04
	Minimum	1045	7,00E+03	0	0
	Maximum	1045	5,00E+04	2,00E+02	8,00E+04
	SD		22035,96	95	38297,08
	VC %		83,95	131,03	127,66
<i>K.pneumoniae I</i> (PEI-B-08-09)	Mittelwert	1047	1,30E+07	1,75E+02	1,45E+06
	Minimum	1047	8,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
	Maximum	1047	4,00E+07	5,00E+02	5,00E+06
	SD		18283234,58	2,36E+02	2,40E+06
	VC %		141,18	135,02	165,28
<i>K.pneumoniae II</i> (PEI-B-05-01)	Mittelwert	979	5,00E+04	0	0
	Minimum	979	2,00E+04	0	0
	Maximum	979	8,00E+04	0	0
	SD		29439,20289		
	VC %		58,88		
<i>S.marcescens</i> (ATCC 43862)	Mittelwert	1106	2,93E+04	0	0
	Minimum	1106	8,00E+03	0	0
	Maximum	1106	7,00E+04	0	0
	SD		2,90E+04		
	VC %		99,14		
<i>S.aureus</i> (PEI-B-23-07)	Mittelwert	945	2,48E+04	0	0
	Minimum	945	9,00E+03	0	0
	Maximum	945	6,00E+04	0	0
	SD		24019,08963		
	VC %		97,05		
<i>S.epidermidis</i> (PEI-B-13-03)	Mittelwert	1067	2,50E+03	0	0
	Minimum	1067	1,00E+03	0	0
	Maximum	1067	4,00E+03	0	0
	SD		1290,994449		
	VC %		51,64		
<i>S.pyogenes</i> (PEI-B-20-05)	Mittelwert	1023	2,25E+04	0	0
	Minimum	1023	1,00E+04	0	0
	Maximum	1023	4,00E+04	0	0
	SD		15000		
	VC %		66,67		
<i>Y.enterocolitica</i> (DSM 11502)	Mittelwert	986	2,73E+04	0	0
	Minimum	986	9,00E+03	0	0
	Maximum	986	5,00E+04	0	0
	SD		17423,64294		
	VC %		63,94		

Die Tabelle 14 zeigt die Rohdaten aus den 4 Experimenten für die Keime *Bacillus cereus* und *Klebsiella pneumoniae I*, bei denen keine komplette Pathogeninaktivierung erfolgte.

Tabelle 14. Rohdaten für *Bacillus cereus* und *Klebsiella pneumoniae I* in mit 1000 CFU/Beutel gespikten Pool-TKs.

	Experimente	TO (CFU/ml)	Vor PI (CFU/ml)	Tag 5 (CFU/ml)	Tag 7 (CFU/ml)
<i>B.cereus</i> (PEI-B-07-23)	1	1045	4,00E+04	2,00E+02	4,00E+04
	2	1045	5,00E+04	9,00E+01	8,00E+04
	3	1045	8,00E+03	0	0
	4	1045	7,00E+03	0	0
<i>K.pneumoniae I</i> (PEI-B-08-09)	1	1047	4,00E+07	2,00E+02	5,00E+06
	2	1047	8,00E+06	5,00E+02	8,00E+05
	3	1047	3,00E+06	0,00E+00	0,00E+00
	4	1047	8,00E+05	0,00E+00	0,00E+00

Aus der Tabelle 14 ist erkennbar, dass die Bakterienkonzentration für *Klebsiella pneumoniae* im Fall der ineffizienten Pathogeninaktivierung mehr als 1×10^6 CFU/ml betrug. Dabei hat die Bakterienkonzentration die Inaktivierungskapazität des Verfahrens überschritten. Die fehlende komplette Inaktivierung beim Stamm *Bacillus cereus* lässt sich in Analogie zu den Vollblutexperimenten dadurch erklären, dass das Bakterium sowohl in seiner vegetativen Form als auch in seiner sporiden Form gespikt wurde und das Intercept – Reagenz von Sporen nur ungenügend aufgenommen wird.

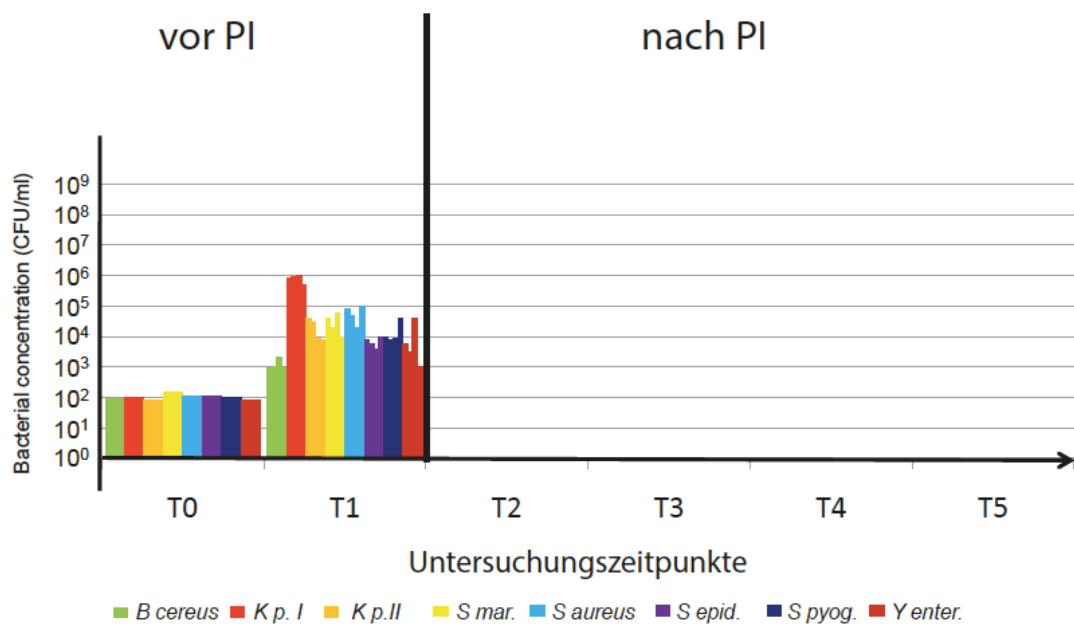
5.4. Phase 4: Experimente an Apherese-TKs

Für diese Experimente wurden bereits fertige Apherese-TKs verwendet und mit den unter Punkt 5.1 aufgeführten Bakterienstämmen in zwei verschiedenen Konzentrationen (A: 100 CFU/ Beutel; B: 1000 CFU/Beutel) gespikt. Der Zeitraum zwischen dem Spiken und der Inaktivierung betrug für diese Experimente 12 Stunden. Für jedes Bakterium wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt. Für die Experimente sind die Untersuchungszeiten in der Tabelle 15 definiert.

Tabelle 15. Untersuchungszeiträume für Apherese-TK-Experimente.

Zeitpunkt	Definition	Zeit vom Startpunkt (h)
T0	Start des Experiments	0
T1	Vor Pathogeninaktivierung	12
T2	Nach Pathogeninaktivierung	13
T3	Nach CAD – Phase	19
T4	Ende Tag 5 nach Spiken	120
T5	Ende Tag 7 nach Spiken	168

Abbildung 20. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Apherese-TKs mit 100 CFU/Beutel.



Die Abbildung 20 zeigt, dass alle 8 Bakterienstämme in allen Experimenten komplett inaktiviert wurden, da zu den Untersuchungszeiträumen T2, T3, T4 und T5 keine Bakterien nachgewiesen werden konnten.

Die Tabelle 16 zeigt für jedes Bakterium die mittlere Konzentration, die minimale Konzentration, die maximale Konzentration, sowie die Standardabweichung.

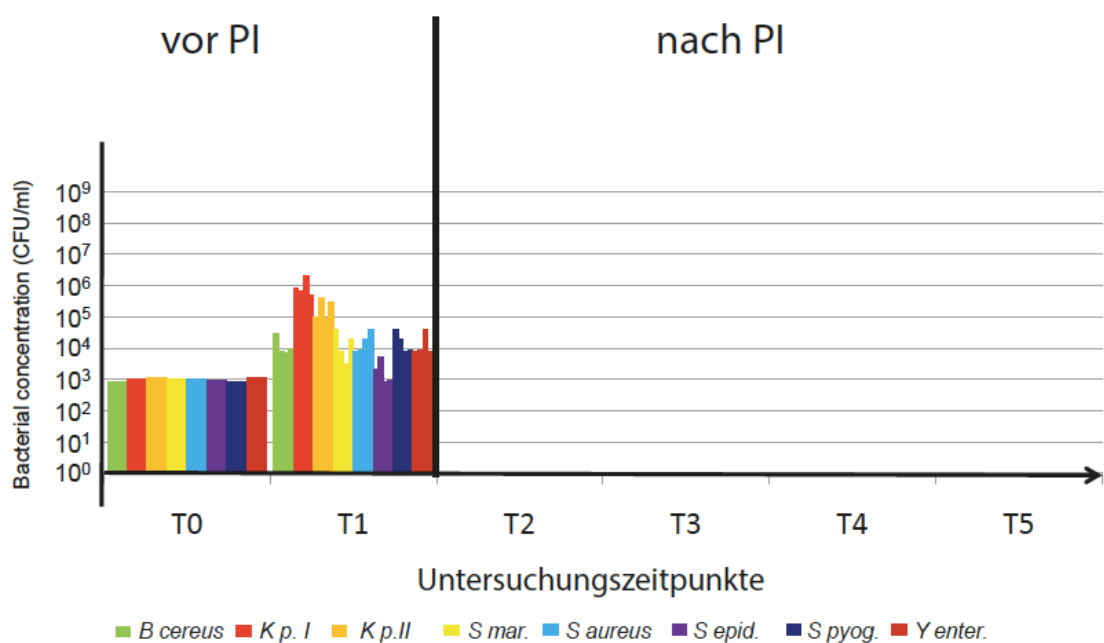
Tabelle 16. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Apherese-TKs mit 100 CFU/Beutel gespikt wurden.

		TO (CFU/ml)	Vor PI (CFU/ml)	Tag 5 (CFU/ml)	Tag 7 (CFU/ml)
<i>B.cereus</i> (PEI-B-07-23)	Mittelwert	91	1,20E+03	0	0
	Minimum	91	9,00E+02	0	0
	Maximum	91	2,00E+03	0	0
	SD		535,41		
	VC %		44,62		
<i>K.pneumoniae I</i> (PEI-B-08-09)	Mittelwert	105	8,00E+05	0	0
	Minimum	105	5,00E+05	0	0
	Maximum	105	1,00E+06	0	0
	SD		216024,69		
	VC %		27		
<i>K.pneumoniae II</i> (PEI-B-05-01)	Mittelwert	83	2,18E+04	0	0
	Minimum	83	8,00E+03	0	0
	Maximum	83	4,00E+04	0	0
	SD		15840,34932		
	VC %		72,83		
<i>S.marcescens</i> (ATCC 43862)	Mittelwert	145	3,25E+04	0	0
	Minimum	145	1,00E+04	0	0
	Maximum	145	6,00E+04	0	0
	SD		2,22E+04		
	VC %		68,23		
<i>S.aureus</i> (PEI-B-23-07)	Mittelwert	111	6,25E+04	0	0
	Minimum	111	2,00E+04	0	0
	Maximum	111	1,00E+05	0	0
	SD		35000		
	VC %		56		
<i>S.epidermidis</i> (PEI-B-13-03)	Mittelwert	107	7,00E+03	0	0
	Minimum	107	4,00E+03	0	0
	Maximum	107	1,00E+04	0	0
	SD		2581,988897		
	VC %		36,89		
<i>S.pyogenes</i> (PEI-B-20-05)	Mittelwert	97	1,68E+04	0	0
	Minimum	97	8,00E+03	0	0
	Maximum	97	4,00E+04	0	0
	SD		15521,49048		
	VC %		92,67		
<i>Y.enterocolitica</i> (DSM 11502)	Mittelwert	83	1,25E+04	0	0
	Minimum	83	1,00E+03	0	0
	Maximum	83	4,00E+04	0	0
	SD		18448,12547		
	VC %		147,59		

Bei den Experimenten für Apherese-TKs erfolgte mit dem Intercept – Verfahren eine komplette Inaktivierung in allen Experimenten.

In den nächsten Experimenten wurde die Spikingkonzentration von 100 CFU/Beutel auf 1000 CFU/Beutel erhöht. Die Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Pathogeninaktivierung dieser Experimente.

Abbildung 21. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Apherese-TKs mit 1000 CFU/Beutel.



Die Abbildung 21 zeigt, zeigt, dass alle 8 Bakterienstämme in allen Experimenten komplett inaktiviert wurden, da zu den Untersuchungszeiträumen T2, T3, T4 und T5 keine Bakterien nachgewiesen werden konnten.

Die Tabelle 17 zeigt für jedes Bakterium die mittlere Konzentration, die minimale Konzentration, die maximale Konzentration, sowie die Standardabweichung.

Tabelle 17. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Apherese- TKs mit 1000 CFU/Beutel gespikt wurden.

		TO (CFU/ml)	Vor PI (CFU/ml)	Tag 5 (CFU/ml)	Tag 7 (CFU/ml)
<i>B.cereus</i> (PEI-B-07-23)	Mittelwert	841	1,38E+04	0	0,00E+00
	Minimum	841	7,00E+03	0	0
	Maximum	841	3,00E+04	0,00E+00	0,00E+00
	SD		10904,89		
	VC %		79,31		
<i>K.pneumoniae I</i> (PEI-B-08-09)	Mittelwert	994	1,00E+06	0,00E+00	0,00E+00
	Minimum	994	5,00E+05	0,00E+00	0,00E+00
	Maximum	994	2,00E+06	0,00E+00	0,00E+00
	SD		678233		
	VC %		67,82		
<i>K.pneumoniae II</i> (PEI-B-05-01)	Mittelwert	1143	2,23E+05	0	0
	Minimum	1143	9,00E+04	0	0
	Maximum	1143	4,00E+05	0	0
	SD		152834,333		
	VC %		68,69		
<i>S.marcescens</i> (ATCC 43862)	Mittelwert	1075	1,78E+04	0	0
	Minimum	1075	3,00E+03	0	0
	Maximum	1075	4,00E+04	0	0
	SD		1,65E+04		
	VC %		92,73		
<i>S.aureus</i> (PEI-B-23-07)	Mittelwert	1021	1,93E+04	0	0
	Minimum	1021	8,00E+03	0	0
	Maximum	1021	4,00E+04	0	0
	SD		14863,26568		
	VC %		77,21		
<i>S.epidermidis</i> (PEI-B-13-03)	Mittelwert	942	2,18E+03	0	0
	Minimum	942	8,00E+02	0	0
	Maximum	942	5,00E+03	0	0
	SD		1960,229578		
	VC %		90,13		
<i>S.pyogenes</i> (PEI-B-20-05)	Mittelwert	876	1,93E+04	0	0
	Minimum	876	8,00E+03	0	0
	Maximum	876	4,00E+04	0	0
	SD		14863,26568		
	VC %		77,21		
<i>Y.enterocolitica</i> (DSM 11502)	Mittelwert	1141	1,63E+04	0	0
	Minimum	1141	8,00E+03	0	0
	Maximum	1141	4,00E+04	0	0
	SD		15840,34932		
	VC %		97,48		

Bei den Experimenten mit den Apherese-TKs konnten mit dem Intercept – Verfahren auch bei den höheren Bakterienkonzentrationen alle Bakterien effizient inaktiviert werden, obgleich beim Keim *Klebsiella pneumoniae* auch eine maximale Konzentration vor der Inaktivierung von 2×10^6 CFU/ml vorhanden war.

6. Diskussion

Der HIV-Skandal in den 80-igen Jahren bestätigte, dass die Blutsicherheit jederzeit durch neue oder endemisch nicht einheimische Erreger gefährdet werden kann. Alleine in Deutschland wurden zu diesem Zeitpunkt fast 50% aller Hämophilen, also ca. 1500 Menschen, durch HIV-kontaminierte Gerinnungsfaktoren infiziert. Der HIV-Skandal prägte die Transfusionsmedizin für die weiteren Jahre. Optimierte Herstellungsprozesse, verschärfte Spenderauswahlkriterien und die Entwicklung von neuen sensitiven Nachweisverfahren (Einführung der molekularen Testung) sorgten für eine deutliche Minimierung vor allem der viralen Infektionen in Rahmen einer Hämotherapie.

Das verbleibende Restrisiko für Übertragung von Mikroorganismen und Prionen lässt sich zum Teil durch Testversagen oder Blutspenden im diagnostischen Fenster erklären. Zahlreiche Viren wie Parvovirus B19 oder HAV und verschiedene Bakterienspezies sind routinemäßig für die Testung nicht vorgeschrieben (24). Dies ist auch bei fehlender klinischer Relevanz und großem logistischem Aufwand nicht immer zwingend notwendig. Ausbreitung der Erreger auf neue Regionen stellt eine andere potentielle Kontaminationsquelle dar. Jüngste Ausbrüche der eigentlich in tropischen Regionen beheimateter Viren in den westlichen Ländern (Westnilvirus in den USA, Chikungunya-Virus in Italien und Dengue-Virus in Frankreich und Griechenland) verdeutlichen, dass in Zeiten der Globalisierung mit dem Auftreten neuer Erreger zu rechnen ist (101; 102).

Seit einigen Jahren wird ein Paradigmenwechsel in der Transfusionsmedizin postuliert, indem mehr proaktive und präventive Maßnahmen im Schutz der Blutversorgung eingesetzt werden sollen (103). Dabei stehen immer mehr Pathogenreduktionsverfahren im Fokus, die gegen die meisten klinisch relevanten Viren, Bakterien und Protozoen wirksam sind. Insbesondere im Schutz der Blutversorgung vor neu aufgetretenen Erregern kann eine Einführung von Pathogeninaktivierungsmaßnahmen eine Schlüsselrolle spielen.

Synoptischer Vergleich bakteriellen und viralen Kontaminationen

Auch bei sachgemäßer Herstellung gibt es keine Garantie für die Sterilität jeder einzelnen Blutkomponente. Gegenwärtig überwiegt das bakterielle Infektionsrisiko mit einem Faktor von 500-1000 dem Risiko für transfusionsmedizinisch relevante virale Erkrankungen (HBV, HCV oder HIV-1) (104). Morphologie, Überlebensstrategien, Virulenzmechanismen und letztendlich klinischer Infektionsverlauf von Bakterien und Viren unterscheiden sich grundlegend voneinander. Dies beeinflusst auch präventive und diagnostische Gegenmaßnahmen zum Schutz der Blutsicherheit.

Abhängig vom jeweiligen Virus kann die Viruslast bei infizierten Spendern bis zu 10^{14} IU/ml betragen, ohne dass die Betroffenen symptomatisch werden. Zur Gewährleistung einer Virussicherheit wird die Kombination von gezielten Spenderauswahlkriterien und Testung jedes Spenders auf die entsprechenden Virusmarker sowie in Deutschland zusätzlich die Quarantänelagerung für Plasma eingesetzt. Außerdem stehen für Plasmaprodukte Verfahren zur Virusinaktivierung zur Verfügung. Die Pathogenreduktionskapazität liegt im Bereich von circa 6 log für umhüllte und ist geringer für nichtumhüllte Viren (26). Nach der Einführung der molekularbiologischen Testverfahren konnte das Restrisiko für eine Übertragung einer viralen Infektion deutlich reduziert werden, zum Beispiel für HIV auf ca. 1:5 Millionen (105).

Die in Bezug auf Virussicherheit erfolgreiche Strategie kann nicht zur Detektion einer bakteriellen Kontamination der Blutprodukte einfach übernommen werden. Die serologische und molekularbiologische Spendertestung zur Prävention von bakteriellen Infektionen ist mit Ausnahmen von *Treponema pallidum* aufgrund der großen Speziesbreite routinemäßig nicht umsetzbar (26). Gravierende Bakteriämien gehen typischerweise mit klinischen Symptomen einher, dadurch können die Spender rechtzeitig ausgeschlossen werden. Die häufigste Quelle bakterieller Kontaminationen stellt die Spenderhaut dar, indem meistens durch Punktion einer Talgdrüse Bakterien mit dem ersten Volumenstrom in die Blutspende eingeschleppt werden. Durch verbesserte Spenderauswahlkriterien, standardisierte Desinfektionsverfahren und Predonation-Sampling konnte das posttransfusionelle, bakterielle Restinfektionsrisiko auf 1:2000 gesenkt werden (101). Falls es zu einer bakteriellen Kontamination der

Thrombozyten- oder Vollblutpräparate gekommen ist, beträgt in der Regel die Keimkonzentration zum Zeitpunkt der Spende ca. 10 Keime pro Beutel, die unter der Nachweisgrenze derzeit verfügbaren Methoden liegt. Im Gegensatz zu Viren können sich jedoch Bakterien in Blutkomponenten zwischen Spende und Transfusion weiter vermehren. Aus diesem Grund hätte ein Nachweisverfahren für bakterielle Kontamination, das unmittelbar vor der Transfusion einsetzbar wäre, die beste Aussagekraft. Dies würde jedoch logistische Probleme und nicht akzeptable Zeitverzögerung der Blutpräparat-Ausgabe mit sich bringen.

Angesichts der erwähnten Problematik werden den viralen und bakteriellen Nachweisverfahren unterschiedliche methodische Voraussetzungen gestellt. Während bei viralen Testsystemen zum Beispiel für HIV-1 eine Sensitivität von 10.000 IU/ml ausreicht (Forderung des Paul-Ehrlich-Instituts für Blutprodukte in Deutschland), sollte ein bakterielles Nachweisverfahren sowohl eine hohe analytische Sensitivität von 1 CFU/ml als auch hohe Spezifität aufweisen.

Bakterielle Kontaminationsrate

Nachweis einer bakteriellen Kontamination von Blutprodukten stellt derzeit für die Blutspendedienste eine Herausforderung dar. Die Sterilitätstestung von Blutkomponenten auf bakterielle Kontamination wurde in Deutschland 1997 mit einem Votum des Arbeitskreises Blut als Bestandteil der Qualitätskontrolle eingeführt (106). Zwischen 1999 und 2002 wurden mehrere Maßnahmen in die Prozesse der Blutspende und Komponentenherstellung integriert, um das Risiko einer bakteriellen Kontamination zu minimieren. In Rahmen der Qualitätskontrolle führten die Blutspendedienste in Stichproben eine Testung auf Bakterien mittels Kulturverfahren von Thrombozytenkonzentraten, Erythrozytenkonzentraten und Plasmen durch und publizierten ihre Ergebnisse aus Produktionszeiträumen 1998, 2001 und 2005/2006 (107).

Während die bakterielle Kontaminationsrate bei Apherese-TKs nahezu unverändert blieb, konnte bei Pool-TKs eine Reduktion der Kontaminationsrate um fast 70% im

letzten Beobachtungszeitraum erreicht werden. Nach Einführung der Leukozytendepletion im Oktober 2001 (108) sank die Kontaminationsrate bei Pool-TKs zunächst von 1% auf ca. 0,507%. Seit 2002 liegt die Kontaminationsrate bei Pool-TKs auf einem Niveau von ca. 0,158%, nachdem das Predonationsampling routinemäßig in die Prozesse der Blutspende eingesetzt worden ist (107; 109).

Auch in der 2007 publizierten prospektiven multizentrischen Studie (**Schrezenmeier et al.**) zeigten die Kontaminationsraten der beiden Thrombozytenpräparate keinen signifikanten Unterschied. Die Kontaminationsrate von Pool-TKs lag bei ca. 0,06% und war signifikant geringer als publizierte Daten von 2005/2006. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Studie die Probeentnahme und Inkubation innerhalb von 4 bis 5 Stunden nach dem Produktionsende erfolgte, um die Freigabe des Transfusionsproduktes bei einer bakteriellen Kontamination zu verhindern. Dadurch war das Risiko für den Probefehler und falsch-negative Ergebnisse entsprechend höher (47; 107). Murphy (110) und Pearce (111) publizierten Daten die unterschiedliche Kontaminationsraten der TKs zeigten in zeitlicher Abhängigkeit von der Probeentnahme. Aufgrund der geringeren Bakterienkonzentration gehen die beiden Autoren von um ca. 40% reduzierter Sensitivität bei der Kulturnachweismethode aus.

Die internationalen Ergebnisse bezüglich der Kontaminationsraten bei TKs lassen sich nur schwer miteinander vergleichen. Dies liegt daran, dass die Studien unter unterschiedlichen Bedingungen bezüglich Inokulationsvolumen, Probenentnahme am Anfang oder am Ende der TK-Haltbarkeit, Untersuchung von aeroben und anaeroben versus nur aeroben Keimen durchgeführt wurden. Nicht zuletzt ist die Vergleichbarkeit dadurch begrenzt, dass die Herstellungsprozeduren und Haltbarkeit von TKs in unterschiedlichen Ländern stark voneinander abweichen.

Auch leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate mit Predonationsampling zeigten gegenüber Konzentraten vor der Einführung der beiden Maßnahmen eine signifikante Abnahme der Kontaminationsrate von 0,157% auf 0,029% (107). Im Vollblutpräparat werden die Bakterien zum Teil von den Leukozyten phagozytiert und im Rahmen der Leukozytenfiltration aus dem Blutpräparat eliminiert (112; 113; 114)

Bei Plasmapräparaten nahm die Kontaminationsrate von 1998 auf 2005/2006 um 80% ab und beträgt aktuell ca. 0,019% (107). Dadurch, dass Plasmapräparate unter -30°C aufbewahrt werden und kurz nach dem Auftauen transfundiert werden, sind die Bedingungen für das Überleben und Wachstum der Bakterien äußerst ungünstig (115). Bei fehlender Relevanz liegen auch kaum Daten für Prävalenz der bakteriellen Kontamination in Plasmapräparaten vor.

Patientengruppen

Die bakterielle Kontamination von Blutprodukten birgt für die hämatoonkologischen Patienten lebensbedrohliche Risiken. Zwar gehören die meisten isolierten Bakterien zu der gering virulenten Hautflora wie *Staphylococcus epidermidis* oder *Staphylococcus aureus*, die klinischen Folgen einer Bakteriämie hängen jedoch von vielen Faktoren ab. Ein Traumapatient, der einer Hämotherapie bedarf, kann aufgrund seines intakten Immunsystems diese Keime effektiv bekämpfen. Unter einer Immunsuppression können auch wenig pathogene Bakterien zu einer septischen Reaktion mit Multiorganversagen und letztendlich dem Tod führen.

Verlängerung der Lagerungsdauer von Thrombozytenkonzentraten

In den meist tödlich verlaufenden Fällen fand die Thrombozytentransfusion am Ende der Haltbarkeitsfrist statt. Aus diesem Grund hat der Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit am 09. Juni 2008 das Votum 38 verabschiedet, das die Lagerdauer der Thrombozytenkonzentrate in Deutschland von 5 auf 4 Tage verkürzt.

In den achtziger Jahren konnte man in den USA Thrombozytenkonzentrate, die auf bakterielle Kontamination gescreent wurden, bis zu 7 Tage benutzen. Diese verlängerte Haltbarkeit von 5 auf 7 Tage bringt einige Vorteile, aber auch Nachteile mit sich. Als Vorteil ergibt sich aus der verlängerten Haltbarkeit eine Senkung der Kosten für entsprechende Produkte und eine Erleichterung der Logistik der Blutbanken. Der

Nachteil ist jedoch, dass die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten mit zunehmender Haltbarkeit abnimmt (54). Die kurze Lagerung der Produkte verringert außerdem die Möglichkeit, dass einzelne in dem Produkt vorhandene Bakterien zu großen Mengen heranwachsen.

Aufgrund der erhöhten Möglichkeit einer bakteriellen Kontamination wurde die verlängerte Lagererlaubnis in den USA 1986 von der Food and Drug Administration (FDA) wieder auf fünf Tage reduziert (111). Zudem überprüften Dumont und Aubuchon et al. (112) das Verhalten von Thrombozyten bei einer verlängerten Lagerdauer von 7 Tagen. Dabei wurden die Überlebensrate (survival) und die Erholung (recovery) als prozentualer Anteil, gemessen an den Daten von 5 Tage gelagerten Thrombozyten, ausgedrückt. Die Daten dieser Studie zeigen einen deutlichen Rückgang der Thrombozytenwirksamkeit. Die Erholungsrate war im Durchschnitt um 12,5 % geringer und die Überlebensrate um durchschnittlich 18,4 % verringert gegenüber den Werten von 5 Tage alten Thrombozyten.

Testmethoden

Die Testmethoden kann man einteilen in Kulturmethode (BacT/ALERT, Pall eBDS) und Schnellmethoden (FACS, NAT, Scansystem). Die Schnellmethoden sind den Kulturmethode bezüglich der analytischen Sensitivität unterlegen. Aufgrund der längeren Inkubationszeit (bis zu 7 Tagen) benötigt man bei Kulturmethode eine frühe Probenziehung. Dadurch wird das Risiko des Sample Errors erhöht. Schnellmethoden liefern das Testergebnis innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden. Sofern eine bakterielle Kontamination vorliegt, lässt sich die verminderte analytische Sensitivität der Schnellmethode unter der Annahme, dass zu einem späteren Probezeitpunkt eine höhere Bakterienkonzentration vorliegt, ausgleichen. Eine Probenentnahme kurz vor der Transfusion ist allerdings mit einem erhöhten logistischen Aufwand verbunden. Der weitere Vorteil der Schnellmethoden besteht neben der kurzen Testdauer darin, dass fraglich reaktive Proben zu einem späteren Zeitpunkt erneut untersucht werden können

und so falsch negative Ergebnisse aufgrund initial niedriger Keimzahlen verringert werden.

Schmidt et al. konnten in einem synoptischen Vergleich von zwei Kulturmethoden (BacT/ALERT und Pall eBDS) und einer Schnellmethode (ScansystemTM) zeigen, dass BacT/ALERT die höchste diagnostische Sensitivität (1KBE/ml) besitzt (62). Bei NAT/PCR werden die bakteriellen Konsensussequenzen als Target verwendet. Die Nachweisgrenze liegt derzeit bei 10^1 bis 10^2 CFU/ml und die benötigte Testzeit beläuft sich auf ca. vier Stunden (116). Für das Scansystem wird derzeit eine analytische Sensitivität von ca. 10^3 - 10^4 CFU/ml und eine Testzeit von 70 bis 90 Minuten angegeben und für den Nachweis in Zytofluorometern etwa 10^5 - 10^6 CFU/ml bei einer sehr kurzen Testzeit von etwa 15 Minuten (72).

Pathogeninaktivierung

Jeder Erreger, der während der asymptomatischen Phase der Infektion im Blut vorkommt, kann via Transfusion übertragen werden. Derzeit liegt das Restrisiko für schwerwiegende septische Reaktionen nach Transfusion und tödliche Transfusionsreaktionen bei 1:50.000 bzw. 1:150.000 (23).

Die Pathogeninaktivierung ist eine Option, mit deren Hilfe die Blutsicherheit zusätzlich verbessert werden kann. Ein großer Vorteil dieser Technologie ist ein breites Wirkungsspektrum gegen die meisten klinisch relevanten Viren, Bakterien und Protozoen. Desweiteren kann die Methode als präventiver Schutz gegen unbekannte oder neu aufgetretene Pathogene dienen. Nicht zuletzt wird mithilfe der Pathogeninaktivierung die Proliferation der in Blutprodukten verbliebenen Leukozyten effektiv gehemmt und dadurch einer möglichen transfusionsassoziierten Transplantat-gegen-Empfänger Erkrankung vorgebeugt. Somit wird die Methode als Alternative zur Gammabestrahlung gesehen.

Ein großer Nachteil der Methode sind die Kosten und die Tatsache, dass derzeit kein gemeinsames zugelassenes Präparat existiert, welches auf alle Blutprodukte angewendet

werden kann. Gerade für Erythrozytenkonzentrate, das am häufigsten transfundierte Blutprodukt, befindet sich eine mögliche Technologie für die Routineanwendung derzeit noch in der klinischen Erprobung. Trotzdem gehen viele Experten und auch einige Behörden von einem signifikanten Sicherheitsgewinn durch die Anwendung der Pathogeninaktivierungsmethoden aus. Laut eines kanadischen Risikomodells würde beim Auftreten eines neuen Erregers allein durch die Verwendung pathogenreduzierter Plasmen und Thrombozytenkonzentrate das Risiko für Infektionsübertragungen durch Blutkonserven um 40 % gesenkt werden (117).

Aktuell haben in Deutschland drei Systeme zur Pathogeninaktivierung von Thrombozytenkonzentraten eine CE-Kennzeichnung: INTERCEPT™, MIRASOL® und THERAFLEX. Die Mirasol- und Intercept-Verfahren werden derzeit routinemäßig in einigen europäischen Ländern (u.a. in Frankreich und in der Schweiz) sowie in Asien eingesetzt. Derzeit ist das THERAFLEX-System in der klinischen Erprobung in Deutschland. Innerhalb Europas ist die Bereitschaft pathogenreduzierte Plasmen und Thrombozyten einzusetzen sehr unterschiedlich ausgeprägt. Nach Anordnung der Schweizer Aufsichtsbehörde Swiss-Medic sind die tödlichen Verläufe von septischen Transfusionsreaktionen durch bakteriell kontaminierte TKs zu vermeiden. Nach statistischer Berechnung wäre ein tödlicher Transfusionszwischenfall pro Jahr zu erwarten. In Deutschland ergab die Analyse der Hämovigilanzdaten (118), dass die meisten schweren Transfusionszwischenfälle durch die Thrombozytenkonzentrate am 5. Tag ihrer Haltbarkeit stattfanden. Darauf wurde die Haltbarkeit von TKs um einen Tag verkürzt.

Alle genannten Verfahren weisen Unterschiede im Wirkungsspektrum sowie Lücken in ihrer Inaktivierungskapazität auf. Das INTERCEPT-Verfahren zeigt eine eingeschränkte oder keine Wirksamkeit zur Inaktivierung von sporenbildenden Bakterien sowie nichtumhüllten Viren, wie Parvovirus B19, Hepatitis A und E (24). Laut neueren Daten weist das MIRASOL-Verfahren eine gute Wirksamkeit für Bakterien und einige Protozoen bei unterschiedlich wirksamer Inaktivierung von Viren (119). Das von den DRK-Blutspendediensten entwickelte THERAFLEX-Verfahren ist hoch effektiv gegen Bakterien, Protozoen und die meisten Viren. Lediglich für HIV

werden moderate Abreicherungsraten von ca. 1-2 logarithmische Stufen erreicht (36; 120). Dies ist aber im Hinblick auf die Effizienz des Verfahrens unkritisch, da in der Routine hochsensitive molekularbiologische Screeningmethoden für HIV bei Blutspenden eingesetzt werden (24). In der publizierten Literatur zeigen die meisten Pathogeninaktivierungsverfahren je nach Virus oder Bakterienspezies Pathogenreduktionskapazität von ca. 6 log an.

Trotz der inzwischen profunden Datenlage bezüglich des Sicherheitsgewinns durch die Anwendung von Inaktivierungsmethoden bleiben eine Reihe von Bedenken, die deren flächendeckenden Einsatz im Wege stehen. Die Pathogeninaktivierung durch INTERCEPT™ führt aufgrund der Inkubations- und Adsorptionsschritte zu einem signifikanten Thrombozytenverlust von bis zu 15 % (121). Dieser ließe sich durch höhere Thrombozytenzahl zu Beginn des Pathogeninaktivierungs-Prozesses als in Standard-Thrombozytenkonzentraten ausgleichen. Das erfordert ein zusätzliches Buffy-coat für gepoolte Thrombozytenkonzentrate und erlaubt in der Regel die Entnahme von höchstens 2 ATK pro Apherese (119). Insbesondere diejenigen Verfahren, bei denen chemische Zusatzstoffe in die Blutprodukte beigemischt werden, können theoretisch akute und chronische Toxizitäten auslösen. Für alle drei Systeme gibt es bislang weder aus den klinischen Studien noch aus Hämovigilanzdaten Hinweise auf Probleme bezüglich Toxizität, Sensibilisierung oder Neo-Antigenität (119). Trotz allem ist es nicht auszuschließen, dass gerade alkylierende Stoffe wie das Amotosalen oder deren Derivate bei einem kleinen Teil der Transfusionsempfänger langfristig kanzerogen oder immunogen wirken (24).

Mutmaßlich sind es auch die höheren Präparatkosten, die die Akzeptanz bei den Anwendern und Kostenträgern beeinflussen. Die Pathogeninaktivierung ermöglicht, eine Vielzahl infektiöser Erreger einschließlich neu auftretender Pathogene zu inaktivieren, die Haltbarkeitsdauer von Thrombozytenkonzentraten zu verlängern und die Häufigkeit akuter Transfusionsreaktionen zu reduzieren. Unter Berücksichtigung des klinischen und sicherheitsrelevanten Nutzens wurden Modellberechnungen für das INTERCEPT-Verfahren erstellt (1). Die geschätzten Durchschnittskosten für akute Transfusionsreaktion Grad 1 und 2, unabhängig von der Ursache, und Grad 3

(allergisch) betragen jeweils 104, 238 und 1200 € (122). Es können ungefähr 400 Thrombozytenkonzentraten-bezogene akute Transfusionsreaktionen pro 10^5 Transfusionen vermieden und 77 000 € eingespart werden (123). In verschiedenen Ländern wurde ein Gesamtkostenanstieg von circa 30–50 € pro Pathogeninaktivierungsbehandeltem Thrombozytenkonzentrat errechnet (124; 125; 126).

Trotz mancher Schwachstellen können die Pathogeninaktivierungsmethoden dazu beitragen, die Transfusionssicherheit deutlich zu verbessern. Im Falle des Auftretens schlimmer transfusionsassoziierter Infektionen wird allmählich die fehlende Implementierung von Inaktivierungsmethoden schwer zu vermitteln sein. Schließlich werden die verantwortlichen Behörden entscheiden müssen, wie sie das Sicherheitsbedürfnis in der Transfusionsmedizin mit Blick auf die vorhandenen Ressourcen in der Zukunft bewerten werden.

7. Zusammenfassung

Nachdem die Sicherheit der Blutprodukte in den letzten Jahrzehnten vor allem bei transfusionsmedizinisch relevanten Viren wie HIV-1, HCV und HBV wesentlich durch die Einführung von molekularen Nachweismethoden auf Restrisiken unter 1 zu 1 Million reduziert werden konnte, liegt der aktuelle Fokus der Transfusionsmedizin auf der Vermeidung von bakteriellen Übertragungen. Dabei stehen vor allem die Thrombozytenkonzentrate im Vordergrund, da diese bei Raumtemperatur gelagert werden und somit für viele Bakterien ideale Wachstumsbedingungen darstellen. Die vorliegende Arbeit hat dabei in vier aufeinander aufbauenden Phasen systematisch die klinische Effizienz eines photochemischen Pathogeninaktivierungsverfahrens untersucht.

Phase 1: Darstellung des Wachstumsverhaltens von 8 transfusionsmedizinisch relevanten Keimen mittels der Spiking-Versuche in Thrombozytenkonzentraten. Für die nachfolgenden Phasen sind nur die Bakterienstämme ausgewählt worden, die nachweislich zu einer Vermehrung in Thrombozytenkonzentraten geeignet sind.

Phase 2: In den Experimenten mit Vollblutkonzentraten zeigt sich bei der Spikingkonzentration von 100 CFU/Beutel für alle ausgewählten Keime eine 100%ige Inaktivierungseffizienz. Bei der Anfangskonzentration von 1000 CFU/Beutel ergibt sich für den Keim *Klebsiella pneumoniae* (PEI-B-08-09) eine Inaktivierungseffizienz von 75% und für den Keim *Bacillus cereus* eine Inaktivierungseffizienz von 50%. Alle anderen Keime haben in den Experimenten mit der höheren Spikingkonzentration eine Inaktivierungseffizienz von 100%.

Phase 3: Für den Keim *Klebsiella pneumoniae* (PEI-B-08-09) zeigt sich in den Experimenten mit Pool-TKs schon bei der niedrigen Anfangskonzentration eine Inaktivierungseffizienz von 75%. Bei der Spikingkonzentration von 1000 CFU/Beutel ergibt sich erneut für die Keime *Klebsiella pneumoniae* und *Bacillus cereus* eine Inaktivierungseffizienz von 50%. Alle anderen Keime weisen sowohl bei der niedrigen als auch bei der hohen Bakterienkonzentration eine 100%ige Pathogeninaktivierungseffizienz auf.

Phase 4: In den Experimenten mit Apherese-TKs zeigt sich für alle untersuchten Keime sowohl bei der niedrigen als auch bei der hohen Spikingkonzentration eine 100%ige Inaktivierungseffizienz.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass man mittels photochemischen Pathogeninaktivierungsverfahrens keine 100%ige Inaktivierungseffizienz erreichen kann. Vielmehr ist die Inaktivierungseffizienz zum einen von der bakteriellen Ausgangskonzentration, zum anderen aber auch vom Zeitpunkt der Anwendung des Verfahrens abhängig. Somit sollte der Begriff „ Pathogeninaktivierungsverfahren“ besser durch den Begriff des Pathogenreduktionsverfahrens ersetzt werden. Ferner wird anhand der Ergebnisse deutlich, dass die Anwendung von Pathogenreduktionsverfahren möglichst schnell nach der Spende erfolgen sollte. In diesem Zusammenhang haben Apherese-Thrombozytenkonzentrate gegenüber Pool-Thrombozytenkonzentraten einen Sicherheitsvorteil.

8. Summary

After the safety of blood components in recent decades, especially in transfusion-medicine relevant viruses such as HIV-1, HCV and HBV could be substantially reduced by the introduction of molecular detection methods to residual risks below 1 to 1 million, is the current focus in transfusion medicine to avoid bacterial transmissions. Above all, platelet concentrates are in the foreground, since they are stored at room temperature and thus represent ideal growth conditions for many bacteria. The present work systematically investigated the clinical efficiency of a photochemical pathogen inactivation procedure in four successive phases.

Phase 1: The growth behavior of 8 transfusion-medicine relevant germs could be demonstrated by spiking experiments in platelet concentrates. For the subsequent phases have been selected only the bacterial strains, which are demonstrably suitable for a proliferation in platelet concentrates.

Phase 2: Experiments with the whole blood show an inactivation efficiency of 100 % at the spiking concentration of 100 CFU / bag for all selected germs. At the initial concentration of 1000 CFU/bag, the inactivation efficacy of *Klebsiella pneumoniae* (PEI-B-08-09) is 75% and that of *Bacillus cereus* is 50%. All other germs have an inactivation efficiency of 100% in the experiments with the higher spiking concentration.

Phase 3: Experiments in pooled platelets show an inactivation efficiency of 75% even for the low initial concentration of *Klebsiella pneumoniae* (PEI-B-08-09). At the initial concentration of 1000 CFU/bag again results for the bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus cereus* an inactivation efficiency of 50%. All other germs have an inactivation efficiency of 100 % at both low and high spiking concentrations.

Phase 4: In the experiments with apheresis platelets, all germs show an inactivation efficiency of 100 % at both the low and high initial bacterial concentrations.

Based on these experiments it can thus be shown that the term pathogen inactivation method is not justified since it depends on the initial bacterial concentration but also on the time of application of the method to obtain a 100% inactivation. In consequence, the term should be better substituted by the term pathogen reduction method. Furthermore, it becomes clear from the results that the use of pathogen reduction procedures should take place as soon as possible after the donation. In this context, apheresis platelet concentrates have a safety advantage over pooled platelet concentrates.

9. Literaturverzeichnis

1. **Berger K, Bauer M, Schopohl D, Henschler R, Ostermann H.** Model calculations to quantify clinical and economic effects of pathogen-inactivation in platelet concentrates. *Onkologie*. 2013;36:53–59.
2. **Deutsches Rotes Kreuz.** *Hämotherapie*. 2004, 2:2-3.
3. **Hippokrates.** *De morbis I, Kapitel 1(VI, 200 Littre)*.
4. **Plinius.** *Naturalis Historia* XXX . 10, §88 (IV, 452 Mayhoff).
5. **Mueller-Eckhardt C.** *Transfusionsmedizin*. Berlin Heidelberg New Nork : Springer, 2004.
6. **Blundell J.** *Researches physiological and patholigical. London. ders (1834) the principles and practice of obstetricy*. Southwark : E. Cox, 1825.
7. **Landsteiner K.** Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 1901, 14:1132-4.
8. **Kiefer V.** *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen- Therapie- Methodik*. Berlin Heidelberg : Springer, 2010.
9. **Weck E.** *Festschrift 50 Jahre DRK-Blutspende in Hessen*. Baden-Württemberg-Hessen GmbH : DRK-Blutspendedienst.
10. **Borden CW, Hall WH.** Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination of blood. *N Engl J Med*. 1951; 245(20):760-5.
11. **Offergeld R, Stark K, Hamouda O.** Infektionen bei Blutspendern. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz*. 2003; 46:775- 779.

12. **Seifried E, Müller MM.** Transfusionsmedizin- von der Blutspende zur Biotechnologie. *Transfus Med Hemother.* 2004; 31(suppl 2):112-117.
13. **Offergeld R, Faensen D, Ritter S, Hamouda O.** Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Euro Surveill.* 2005;10(2):pii=522.
14. **Heitmann A, Laue T, Schottstedt V, et al.** Occurrence of hepatitis A virus genotype III in Germany requires the adaptation of commercially available diagnostic test systems. *Transfusion .* 2005; 45:1097-105.
15. **Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, et al.** Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet .* 2004; 363:417-21.
16. **Pincock S.** Patient's death from vCJD may be linked to blood transfusion. Committee to discuss need for further precautions to prevent possible vCJD transmission through blood. *Lancet.* 2004; 363: 43.
17. Arbeitskreis Blut: Was bedeutet die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob- Krankheit für die Sicherheit von Blutprodukten? *Deutsches Ärzteblatt .* 1998 (67), A-1627, Vol. Heft 25.
18. Bericht der Arbeitsgruppe „Gesamtstrategische Blutversorgung angesichts vCJK“
13.04.2006.
19. **Roth WK, Seifried E.** Infektionsrisiken durch Blutkomponenten und Blutprodukte. *Hämotherapie.* 2003, 1.
20. [Online] https://www.blutspende.de/infos-zur-blutspende/news-detail.php?news_id=128.

21. [Online] <https://www.blutspende-nstob.de/Indoor/Spenderinformationen/FAQ/>.
22. **Schmidt M, Sireis W, Seifried E, Nguyen X.D, Klüter H, et al.** Sicherheit der Blutprodukte-Update 2011. *Transfusionsmedizin* . 2011; 1(1): 28-50.
23. **Schmidt M, Duc Nguyen X, Hourfar MK.** Nebenwirkung bei der Anwendung von Blutprodukten. *Hämotherapie*. 2010, 14.
24. **Seltsam A.** Pathogenreduktion von Blutprodukten – ein Paradigmenwechsel in der Transfusionsmedizin. *Hämotherapie*. 2011; 17: 26-34.
25. **Gottlieb T.** Hazards of bacterial contamination of blood products. *Anaesth Intens Care*. 1993;21(1):20-3.
26. **Montag T, Lange H, Schmidt U, Strobel J, Exner M.** Bakterielle Kontamination von Blutprodukten. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 1999, 42:132-142.
27. *Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer: Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Hämotherapie)*. Köln : Deutscher Ärzteverlag, 1996.
28. **Sazama K.** Bacteria in blood for transfusion.A review. *Arch Pathol Lab Med*. 1994; 118(4):350–365.
29. **Morduchowicz G, Pitlik SD, Huminer D, et al.** Transfusion reactions due to bacterial contamination of blood and blood products. *Rev Infect Dis*. 1991;13:307-314.
30. **Barrett BB, Andersen JW, Anderson KC.** Strategies for the avoidance of bacterial contamination of blood components. *Transfusion*. 1993;33: 228-234.

31. **Braine HG, Kickler TS, Charache P, et al.** Bacterial sepsis secondary to platelet transfusion: an adverse effect of extended storage at room temperature. *Transfusion*. 1986; 26:391–393.
32. **Cid J, Lozano M, Nomdedeu B, et al.** Staphylococcal sepsis associated with platelet transfusion: report of a new case and review of the literature. *Sangre (Barc)*. 1997;42: 407–409.
33. **Bösenberg A, Bösenberg E, Sibrowski W.** Problematik der bakteriellen Infektion im Rahmen der Hämotherapie. *Infusionsther Transfusionsmed* . 1994;21:51–57.
34. **Klein HG, Dodd RY, Ness PM, Fratantoni JA, Nemo GJ.** Current status of microbial contamination of blood components: summary of a conference. *Transfusion*. 1997;37(1):95–101.
35. **Jacobs MR, Good CE, Lazarus HM, Yomtovian RA.** Relationship between bacterial load, species virulence, and transfusion reaction with transfusion of bacterially contaminated platelets. *Clin Infect Dis* . 2008; 46:1214-20.
36. **Högman CF, Engstand L.** Serious bacterial complications from blood components. – how do they occur? *Transfus Med* . 1998;8 (1):1–3.
37. **Beecher DJ, Schoeni JL, Wong AC.** Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun*. 1995;63(11):4423-8.
38. **Morduchowicz G, Pitlik SD, Huminer D, et al.** Transfusion reactions due to bacterial contamination of blood and blood products. *Rev Infect Dis*. 1991;13: 307–314.
39. Centers for Disease Control (1991) Bacterial contamination of platelet pools-Ohio. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 41:36–3.

40. **Arduino MJ, Bland LA, Tipple MA, et al.** Erythrocytes, Growth and Endotoxin Production of *Yersinia enterocolitica* and *Enterobacter agglomerans* in Packed. *J Clin Microbiol.* 1989 July; 27(7): 1483–1485.
41. FDA Interims Guidance (1991) Guideline on validation of the Limulus Amebocyte test as an in-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices.
42. **Peters G, Pulverer G.** Micrococcaceae. In: Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G. (Hrsg) Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 7. Auflage. Stuttgart Jena New York : Gustav Fischer Verlag, 1994; 350-360.
43. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) aufgestellt von der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut, in der jeweils gültigen Fassung.
44. **Anderson NA, Gray S, Coplestone JA, et al.** A prospective randomized study of three types of platelet concentrates in patients with haematological malignancy: corrected platelet count increments and frequency of nonhaemolytic febrile transfusion reactions. *Transfus Med.* 1997; 7, 33–39.
45. **Eriksson L, Högman CF.** Platelet concentrates in an additive solution prepared from pooled buffy coats. 1. In vitro studies. *Vox Sang.* 1990;59(3):140-5.
46. **Walther-Wenke G.** Zum Risiko bakteriell bedingter Transfusionsreaktion durch Thrombozytenkonzentrate. *Hämotherapie.* 2007, 10.
47. **Schrezenmeier H, Walther-Wenke G, Muller TH, et al.** Bacterial contamination of platelet concentrates: results of a prospectivemulticenter study comparing pooled whole blood-derived platelets and apheresis platelets. *Transfusion.* 2007;47: 644-52.

48. **Greinacher A, Kiefel V, Klüter H, Kroll H, Pötzsch B, Riess H.** Empfehlungen zur Thrombozytentransfusion der Thrombozyten-Arbeitsgruppe der DGTI, GTH und DGHO. *Transfus Med Hemother.* 2006;33:528–543.
49. **Graul A, Heiden M, Gräf K, Keller-Stanislawski B.** Hämovigilanz in Deutschland – Berichte aus dem Paul-Ehrlich-Institut über Verdachtsfälle von Transfusionsreaktionen im Beobachtungszeitraum Januar 1995 bis Dezember 2002. *Transfus Med Hemother.* 30:232-238, 2003.
50. Transfusionsgesetz (TFG).In:BGBl.I. 1998: 1752.
51. Mitteilung des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit: Festlegung der Haltbarkeitsfrist von Thrombozytenkonzentraten mit dem Ziel der Reduktion lebensbedrohlicher septischer Transfusionsreaktionen durch bakterielle Kontamination. Votum 38. 09.Juni 2008.
52. **de Korte D, Curvers J, de Kort WL, et al.** Effects of skin disinfection method, deviation bag, and bacterial screening on clinical safety of platelet transfusions in the Netherlands. *Transfusion.* 2006; 46:476-85.
53. **Mc Donald CP, Roy A, Mahajan P, et al.** Relative values of the interventions of diversion and improved donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. *Vox Sang.* 2004; 86:178-82.
54. **Wagner SJ, Robinette D, Friedmann LI, Miripol J.** Diversion of initial blood flow to prevent whole-blood contamination by skin surface bacteria: an in vitro model. *Transfusion.* 2000; 40:335-8.

55. **de Korte D, Marcelis JH, Verhoeven AJ, Soeterboek AM.** Diversion of first blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole-blood collections. *Vox Sang* . 2002; 83:13-6.
56. Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens (Transfusionsgesetz) vom 1. Juli 1998, BGB I §5.
57. **Pietersz RN, Engelfriet CP, Reesink HW, et al.** Detection of bacterial contamination of platelet concentrates. *Vox Sang*. 2007;93: 260-77.
58. **Wagner SJ.** Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sang*. 2004; 86(3):157-63.
59. **te Boekhorst PA, Beckers EA, Vos MC, et al.** Clinical significance of bacteriologic screening in platelet concentrates. *Transfusion*. 2005;45: 514-9.
60. **Eder AF, Kennedy JM, Dy BA, et al.** Bacterial screening of apheresis platelets and the residual risk of septic transfusion reactions: the American Red Cross experience (2004-2006) . *Transfusion* . 2007;47: 1134-42.
61. **Fang CT, Chambers LA, Kennedy J, et al.** Detection of bacterial contamination in apheresis platelet products: American Red Cross experience, 2004. *Transfusion* . 2005;45: 1845-52.
62. **Schmidt M, Karakassopoulos A, Burkhart J, et al.** Comparison of three bacterial detection methods under routine conditions. *Vox Sang* . 2007;92: 15-21.
63. **McDonald CP, Pearce S, Wilkins K, et al.** Pall eBDS: an enhanced bacterial detection system for screening platelet concentrates. *Transfus Med*. 2005;15: 259-68.

64. **Holme S, McAlister MB, Ortolano GA, et al.** Enhancement of a culture-based bacterial detection system (eBDS) for platelet products based on measurement of oxygen consumption. *Transfusion* . 2005;45: 984-93.
65. **Ortolano G, Freundlich L, Holme S, et al.** Detection of bacteria in WBC-reduced PLT concentrates using percent oxygen as a marker for bacterial growth. *Transfusion*. 2004; 43:1276-85.
66. **Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, et al.** A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *J Microbiol Methods* . 2003; 52:379-88.
67. **Suzuki Y, Yoshikawa K, Yokochi T.** A new sensitive and rapid automated fluorometric assay for detection of natural killer activity using carboxyfluorescein diacetate. *J Immunoassay* . 1991; 12:145-57.
68. **Mohammadi T, Pietersz RN, Vandenbroucke-Grauls CM, et al.** Detection of bacteria in platelet concentrates: comparison of broad-range real-time 16S rDNA polymerase chain reaction and automated culturing. *Transfusion* . 2005;45: 731-6.
69. **Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N.** Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002;148: 257-66.
70. **Schmidt M, Hourfar MK, Nicol SB, et al.** A comparison of three rapid bacterial detection methods under simulated real-life conditions. *Transfusion* . 2006;46: 1367-73.
71. **Schmidt M, Hourfar MK, Nicol SB, et al.** FACS technology used in a new rapid bacterial detection method. *Transfus Med*. 2006;16: 355-61.

72. **Mohr H, Lambrecht B, Bayer A, et al.** Sterility testing of platelet concentrates prepared from deliberately infected blood donations. *Transfusion* . 2006;46: 486-91.
73. [Online]
http://www.interceptbloodsystem.com/documents/Platelets_Technical_Data_Sheet_v3.0_German.pdf.
74. **Irsch J, Lin L.** Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood Components for Transfusion Using the INTERCEPT Blood System™. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* . 2011;38:19-31.
75. **Marschner S, Goodrich R.** Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* . 2011;38:8-18.
76. [Online] <http://www.caridianbct.com/location/north-america/products-and-services/Pages/mirasol-pathogen-reduction-technology.aspx>.
77. **Seltsam A, Mueller TH.** UVC irradiation for pathogen reduction of platelet concentrates and plasma. *Transfus Med Hemother* . 2011;38:43-54.
78. **Henschler R, Seifried E, Mufti N.** Development of the S-303 Pathogen Inactivation Technology for Red Blood Cell Concentrates. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* . 2011;38:33-42.
79. **North A, Ciaravino V, Mufti N, Corash L.** Preclinical pharmacokinetic and toxicology assessment of red blood cells prepared with S-303 pathogen inactivation treatment. *Transfusion*. 2011; 51(10): 2208–2218.

80. **North AK, Henschler R, Geisen C, et al.** Evaluation of naturally occurring antibodies to pathogen inactivated red blood cells. *Transfusion*. 2010;50 (suppl):38A.
81. **Ettinger A, Miklauz MM, Hendrix BK, et al.** Protein stability of previously frozen plasma, riboflavin and UV light-treated, refrozen and stored for up to 2 years at -30 degrees C. *Transfus Apher Sci*. 2011;44:25-31.
82. **van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP et al.** Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euro-SPRITE trial. *Blood*. 2003;101:2426-2433.
83. **Kerkhoffs JL, van Putten WL, Novotny VM et al.** Clinical effectiveness of leucoreduced, pooled donor platelet concentrates, stored in plasma or additive solution with and without pathogen reduction. *Br J Haematol* . 2010;150:209-217.
84. A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology. *Transfusion* . 2010;50:2362-2375.
85. **Cazenave JP, Isola H, Waller C, et al.** Use of additive solutions and pathogen inactivation treatment of platelet components in a regional blood center: impact on patient outcomes and component utilization during a 3-year period. *Transfusion*. 2011;51:622-629.
86. **Gelderman MP, Chi X, Zhi L, Vostal JG.** Ultraviolet B light-exposed human platelets mediate acute lung injury in a two-event mouse model of transfusion. *Transfusion*. 2011.
87. **Corash L, Lin JS, Sherman CD, Eiden J.** Determination of acute lung injury after repeated platelet transfusions. *Blood*. 2011;117:1014-1020.

88. **Walther-Wenke G, Wirsing von König CH, Däubener W, et al.** Monitoring bacterial contamination of blood components in Germany: effect of contamination reduction measures. *Vox Sanguinis*. 2011; 100(4):359-66.
89. **Funk MB, Günay S, Lohmann A, Henseler O, Keller-Stanislawski B.** Bewertung der Maßnahmen zur Reduktion schwerwiegender Transfusionsreaktionen (Hämovigilanzdaten von 1997 bis 2008). *Bundesgesundheitsbl*. 2010; 53:347–356.
90. **Schrezenmeier H, Walther-Wenke G, Müller TH, et al.** Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical follow-up. *Ann Hematol*. 2010; 89:83-91.
91. **Brecher ME, Hay SN, Rothenberg SJ.** Monitoring of apheresis platelet bacterial contamination with an automated liquid culture system: a university experience. *Transfusion*. 2003; 43(7):974-8.
92. **Macauley A, Chandrasekar A, Geddis G, Morris KG, McClelland WM.** Operational feasibility of routine bacterial monitoring of platelets. *Transfus Med*. 2003;13(4):189-95.
93. **Munksgaard L, Albjerg L, Lillevang ST, Gahrn-Hansen B, Georgsen J.** Detection of bacterial contamination of platelet components: six years' experience with the BacT/ALERT system. *Transfusion*. 2004; 44(8):1166-73.
94. **Ramírez-Arcos S, Jenkins C, Dion J, et al.** Canadian experience with detection of bacterial contamination in apheresis platelets. *Transfusion*. 2007;47(3):421-9.
95. **S, Wollowitz.** Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Semin Hematol*. 2001; 38(4 Suppl 11):4-11.

96. [Online] www.interceptbloodsystem.com/product-overview/amosalen-mechanism-of-action.html.

97. [Online] <http://www.interceptbloodsystem.com/product-overview/amosalen-mechanism-of-action.html>.

98. [Online] https://interceptbloodsystem.com/sites/default/files/resources/prd-tds_00120-ge_v7.0_secured.pdf.

99. [Online] <http://www.interceptbloodsystem.com/product-overview/amosalen-mechanism-of-action.html>.

100. [Online]

<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/UCM427525.pdf>.

101. **Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, et al.** West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion*. 2003;43:1018-1022.

102. **Bianco C.** Dengue and Chikungunya viruses in blood donations: risks to the blood supply? *Transfusion*. 2008;48:1279-128.

103. **Klein HG, Anderson D, Bernardi MJ, et al.** Pathogen inactivation: making decisions about new technologies. Report of a consensus conference. *Transfusion*. 2007;47:2338-2347.

104. **Goodnough LT.** Risks of blood transfusion. *Crit Care Med*. 2003; 31:S678-86.

105. [Online] http://www.focus.de/gesundheit/ratgeber/medizinskandal/aerztefehler-und-betrug_aid_132025.html.

106. Arbeitskreis Blut: Mindestanforderungen zur Sterilitätstestung von Blutkomponenten. 23. Sitzung des Arbeitskreises Blut am 05.06.1997. *Bundesgesundheitsblatt*. 1997;8:307–309.
107. **Walther-Wenke G, Däubener W, Heiden M, et al.** Effect of Safety Measures on Bacterial Contamination Rates of Blood Components in Germany. *Transfus Med Hemother*. 2011; 38(4): 231–235.
108. Arbeitskreis Blut: Zusätzliche Risikovorsorge bei Blutspenden: Beschleunigte Einführung der Leukozytendepletion und Spenderausschluss bei mehr als sechsmonatigem Aufenthalt im Vereinigten Königreich. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*. 2001;44:110–111.
109. Arbeitskreis Blut: Einführung des Predonation Samplings. 48. Sitzung des Arbeitskreises Blut am 26.06.2002. *Bundesgesundheitsblatt*. 2002;45:756.
110. **Murphy WG, Foley M, Doherty C, et al.** Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to product safety. *Vox Sang*. 2008;95:13–19.
111. **Pearce S, Rowe GP, Field SP.** Screening of platelets for bacterial contamination at the Welsh Blood Service. *Transfus Med*. 2011;21:25–32.
112. **Siblini L, Lafeuillade B, Ros A, et al.** Influence of blood storage conditions and white blood cell filtration on the bacterial load of blood deliberately inoculated with Gram-positive and Gram-negative pathogens. *Vox Sang*. 2004;87:241–249.
113. **Buchholz DH, AuBuchon JP, Snyder EL, et al.** Effects of white cell reduction on the resistance of blood components to bacterial multiplication. *Transfusion*. 1994;34:852–857.

114. **Högman CF, Gong J, Erisksson I, et al.** White cells protect donor blood against bacterial contamination. *Transfusion*. 1991;31:620–626.
115. **Wagner SJ, Friedman LI, Dodd RY.** Transfusion-associated bacterial sepsis. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7:290–302.
116. **Schmidt M, Weis C, Heck J, et al.** Optimized Scansystem platelet kit for bacterial detection with enhanced sensitivity: detection within 24h after spiking. *Vox Sanguinis*. 2005;89(3):135-139.
117. **Kleinman S, Cameron C, Custer B, et al.** Modeling the risk of an emerging pathogen entering the Canadian blood supply. *Transfusion*. 2010;50:2592-2606.
118. **Funk MB, Heiden M, Volkert P, Lohmann A, Keller-Stanislawski B.** Evaluation of Risk Minimisation Measures for Blood Components - Based on Reporting Rates of Transfusion-Transmitted Reactions (1997-2013). *Transfus Med Hemother*. 2015; 42(4): 240–246.
119. **Offergeld R.** Pathogen-Inaktivierungssysteme für Thrombozytenkonzentrate. *Bundesgesundheitsbl*. 2018; 61:874–893.
120. **Schlenke P.** Pathogen inactivation technologies for cellular blood components: an update. *Transfus Med Hemother*. 2014; 41(4): 309–325.
121. **Johnson L, Loh YS, Kwok M, Marks DS.** In vitro assessment of buffy-coat derived platelet components suspended in SSP+ treated with the INTERCEPT Blood system. *Transfus Med*. 2013;23:121–129.

122. **Osselaer JC, Messe N, Hervig T, et al.** A prospective observational cohort safety study of 5106 platelet transfusions with components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment. *Transfusion*. 2008;48:1061-1071.
123. **Cazenave JP, Isola H, Waller C, et al.** Use of additive solutions and pathogen inactivation treatment of platelet components in a regional blood center: Impact on patient outcomes and component utilization during a 3-year period. *Transfusion*. 2011;51:622-629.
124. **Moeremans K, Warie H, Annemans L.** Assessment of the economic value of the intercept blood system in Belgium. *Transfus Med*. 2006;16:17-30.
125. **Bell CE, Botteman MF, Gao X, et al.** Cost-effectiveness of transfusion of platelet components prepared with pathogen inactivation treatment in the United States. *Clin Ther*. 2003;25:2464-2486.
126. **Staginnus U, Corash L.** Economics of pathogen inactivation technology for platelet concentrates in Japan. *Int J Hematol*. 2004;80:317-324.

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Blutpräparate aus Vollblut- und Apherese-Spenden.	11
Tabelle 2. Einteilung der Nebenwirkungen bei Anwendung von Blutprodukten.	14
Tabelle 3. Präventive Maßnahmen der bakteriellen Kontamination von Blutprodukten	21
Tabelle 4. Bakterienspektrum bei der TK-Kontamination.	32
Tabelle 5. Bakterienspektrum für die Studie mit dem Intercept-Verfahren.	34
Tabelle 6. Untersuchungszeiträume für Vollblutexperimente.	60
Tabelle 7. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Vollblutprodukte mit 100 CFU/Beutel gespikt wurden.	62
Tabelle 8. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Vollblutprodukte mit 1000 CFU/Beutel gespikt wurden.	65
Tabelle 9. Rohdaten für <i>Bacillus cereus</i> und <i>Klebsiella pneumoniae</i> in mit 1000 CFU/Beutel gespikten Vollblutpräparaten	66
Tabelle 10. Untersuchungszeiträume für Pool-TK-Experimente.	67
Tabelle 11. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Pool-TKs mit 100 CFU/Beutel gespikt wurden.	69
Tabelle 12. Rohdaten für <i>Klebsiella pneumoniae</i> aus allen 4 Experimenten.	70
Tabelle 13. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Pool-TKs mit 1000 CFU/Beutel gespikt wurden.	72
Tabelle 14. Rohdaten für <i>Bacillus cereus</i> und <i>Klebsiella pneumoniae</i> in mit 1000 CFU/Beutel gespikten Pool-TKs	73
Tabelle 15. Untersuchungszeiträume für Apherese-TK-Experimente.	74

Tabelle 16. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Apherese-TKs mit 100 CFU/Beutel gespikt wurden.	76
Tabelle 17. Bakterienkonzentration in Experimenten, in denen Apherese-TKs mit 1000 CFU/Beutel gespikt wurden.	78

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Verteilung der Blutspenden in der Medizin.	11
Abbildung 2. Verdünnungsprozess.	36
Abbildung 3. Vollblutpräparat nach Zentrifugation.	39
Abbildung 4. Molekularer Wirkmechanismus von Amotosalen.	40
Abbildung 5. INTERCEPT-System und dessen Schritte.	41
Abbildung 6. Schematische Darstellung des Studienverlaufs für Vollblutpräparate.	47
Abbildung 7. Schematische Darstellung des Studienverlaufs für Thrombozytenpräparate.	50
Abbildung 8. Wachstumskinetik <i>Bacillus cereus</i> in Thrombozytenkonzentraten.	52
Abbildung 9. Wachstumskinetik <i>Klebsiella pneumoniae</i> 01 in Thrombozytenkonzentraten.	53
Abbildung 10. Wachstumskinetik <i>Klebsiella pneumoniae</i> 02 in Thrombozytenkonzentraten.	54
Abbildung 11. Wachstumskinetik <i>Serratia marcescens</i> in Thrombozytenkonzentraten.	55
Abbildung 12. Wachstumskinetik <i>Staphylococcus epidermidis</i> in Thrombozytenkonzentraten.	56
Abbildung 13. Wachstumskinetik <i>Staphylococcus aureus</i> in Thrombozytenkonzentraten.	57
Abbildung 14. Wachstumskinetik <i>Streptococcus pyogenes</i> in Thrombozytenkonzentraten.	58
Abbildung 15. Wachstumskinetik <i>Yersinia enterocolitica</i> in Thrombozytenkonzentraten.	59

Abbildung 16. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Vollblutprodukte mit 100 CFU/Beutel.....	61
Abbildung 17. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Vollblutprodukte mit 1000 CFU/Beutel.....	63
Abbildung 18. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Pool-TKs mit 100 CFU/Beutel.....	67
Abbildung 19. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Pool-TKs mit 1000 CFU/Beutel.....	70
Abbildung 20. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Apherese-TKs mit 100 CFU/Beutel.....	74
Abbildung 21. Ergebnisse der Pathogeninaktivierung nach Spiken der Apherese-TKs mit 1000 CFU/Beutel.....	77

12. Abkürzungsverzeichnis

A-TK	Apherese-Thrombozytenkonzentrate
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BC	Buffy coat
C	Celsius
CAD	Compound Adsorption Device
CFU	colony-forming units
CJK	Creutzfeld-Jakob-Krankheit
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
g	Erdbeschleunigung
GvHD	Graft-versus-host disease

h	Stunde
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HEV	Hepatitis E Virus
HGV	Hepatitis G Virus
HHV-5	Humanes Herpesvirus 5
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HTLV I/II	Humanes T-Zelleukämievirus Typ I und Typ II
IgG	Immunglobulin G
J	Joule
KBE	Koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharide
log	Logarithmus
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Kochsalz
NAT	nucleic acid test
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
NZ	nicht zählbar
O ₂	Sauerstoff
Pall eBDS	The Pall enhanced bacterial detection system
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
Pool-TK	Pool-Thrombozytenkonzentrate
RNA	Ribonukleinsäure
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrom
TK	Thrombozytenkonzentrat
TSCD-Gerät	Blutbeutels-Schlauch-Schweißgerät
TTV	Torque teno virus
UVA	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 315 bis 380 nm

UVB	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 280 bis 315 nm
UVC	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 100 bis 280 nm
vCJK	variante Creutzfeld-Jakob-Krankheit
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
WNV	West-Nil-Virus