

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

betreut am

DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen gGmbH
Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. E. Seifried

**Effizienz von bakteriellen Schnelltestmethoden am Beispiel von
Thrombozytenkonzentraten**

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

vorgelegt von

Lea Andrea Heike Stiller

aus Limburg an der Lahn

Frankfurt am Main, 2020

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Michael Schmidt
Korreferent/in:	Prof. Dr. David Groneberg
Tag der mündlichen Prüfung:	02.03.2021

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	5
II	Tabellenverzeichnis	6
III	Abkürzungsverzeichnis	16
1	EINLEITUNG	19
1.1	Blutspende und Herstellung von Thrombozytenkonzentraten	20
1.1.1	Durchführung und Verarbeitung der Vollblutspende	20
1.1.2	Durchführung von Apheresen	22
1.2	Lagerung und Haltbarkeit von Blutprodukten	24
1.3	Transfusion von Blutprodukten am Beispiel Thrombozytenkonzentrate	26
1.3.1	Komplikationen von Thrombozytentransfusionen.....	27
1.3.1.1	Infektionen durch Thrombozytentransfusionen.....	29
1.4	Zielsetzung der Arbeit	38
2	MATERIAL UND METHODEN.....	39
2.1	Materialien.....	39
2.1.1	Apparaturen	39
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	40
2.1.3	Bakterienstämme	41
2.1.4	Reagenzien Bactiflow	41
2.1.5	Zubehör PCR	42
2.2	Methoden	45
2.2.1	Untersuchung bakterieller Transfusionszwischenfälle Mai/Juni 2016	45
2.2.1.1	Untersuchte Bakterien.....	45
2.2.1.2	Aufbau und Ablauf.....	47
2.2.2	Bactiflow-, PCR- und BacT/ALERT-Mini-Pool-Tests	48
2.2.2.1	Bactiflow-Methode.....	48
2.2.2.2	Realtime-PCR-Methode.....	50
2.2.2.3	BacT/ALERT Methode	51

2.2.2.4	Aufbau und Ablauf.....	52
2.2.3	Transportvalidierung	54
2.2.3.1	Beschreibung der Methoden.....	54
2.2.3.2	Aufbau und Ablauf.....	54
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Untersuchung Transfusionszwischenfälle:	55
3.1.1	Zwischenfall 1: <i>Staphylococcus epidermidis</i>	56
3.1.2	Zwischenfall 2: <i>Streptococcus dysgalacticae</i>	57
3.1.3	Zwischenfall 3: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	58
3.1.4	Gesamtergebnis Untersuchung Transfusionszwischenfälle.....	59
3.2	Ergebnisse Bactiflow-, PCR und BacT/ALERT Mini-Pool-Tests.....	60
3.2.1	Pool-TK-Messungen.....	61
3.2.2	Apherese-Messungen.....	95
3.3	Transportvalidierung.....	118
3.4	Auswertung der Routinedaten	138
4	DISKUSSION	140
4.1	Transfusionszwischenfälle	140
4.2	Bactiflow-, PCR- und BacT/ALERT-Mini-Pool-Tests.....	144
4.3	Transportvalidierung.....	157
4.4	Routineanwendung.....	162
5	AUSBLICK.....	163
6	ZUSAMMENFASSUNG	168
7	SUMMERY	170
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	172
9	EIGENE VERÖFFENTLICHUNG.....	185
10	LEBENS LAUF	186
11	DANKSAGUNG	188
12	SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG.....	189

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einsatzgebiete für Blutspenden.....	20
Abbildung 2: Ablauf Untersuchung Transfusionszwischenfälle	47
Abbildung 3: Bactiflow-Gerät	48
Abbildung 4: Realtime-PCR-Gerät	50
Abbildung 5: BacT/ALERT Kulturmedien	51
Abbildung 6: Ablauf Bactiflow-, BacT/ALERT- und PCR- Mini-Pool-Tests	53
Abbildung 7: Ablauf Transportvalidierung	54
Abbildung 8: Übersicht Wachstumskinetiken	55
Abbildung 9: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von der Poolgröße bei Pool-TKs	93
Abbildung 10: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von dem Untersuchungstag bei Pool-TKs.....	94
Abbildung 11: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von der Poolgröße bei Apherese-TKs	117
Abbildung 12: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von dem Untersuchungstag bei Apherese-TKs.....	117
Abbildung 13: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von der Poolgröße bei Pool-TKs	137
Abbildung 14: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von dem Untersuchungstag bei Pool-TKs.....	137
Abbildung 15: Anzahl der Thrombozytenkonzentrate, die mit dem Bactiflow-Verfahren untersucht wurden.....	138
Abbildung 16: Anzahl der Bactiflow positiven Thrombozytenkonzentrate	139

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht TBBI-Meldungen nach Jahren	31
Tabelle 2: Verzeichnis Apparaturen	39
Tabelle 3: Verzeichnis Verbrauchsmaterialien	40
Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme	41
Tabelle 5: Reagenzienverzeichnis Bactiflow	41
Tabelle 6: 2 x QuantiTect Multiplex PCR-Mastermix	42
Tabelle 7: PCR-Materialien Primer und Sonden.....	42
Tabelle 8: PCR-Materialien Enzyme	43
Tabelle 9: PCR-Materialien Sonstiges	43
Tabelle 10: PCR-Materialien Interne Kontrolle	43
Tabelle 11: PCR-Materialien Positivkontrolle	44
Tabelle 12: Ergebnisse Bactiflow <i>S. aureus</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Counts	61
Tabelle 13: Ergebnisse PCR <i>S. aureus</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten	61
Tabelle 14: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. aureus</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	62
Tabelle 15: Ergebnisse Bactiflow <i>S. aureus</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts	62
Tabelle 16: Ergebnisse PCR <i>S. aureus</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten	63
Tabelle 17: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. aureus</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	63
Tabelle 18: Ergebnisse Bactiflow <i>S. aureus</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts .64	
Tabelle 19: Ergebnisse PCR <i>S. aureus</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten	64
Tabelle 20: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. aureus</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	65
Tabelle 21: Ergebnisse Bactiflow <i>S. epidermidis</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Counts .65	
Tabelle 22: Ergebnisse PCR <i>S. epidermidis</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten	66
Tabelle 23: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. epidermidis</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	66
Tabelle 24: Ergebnisse Bactiflow <i>S. epidermidis</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts	67
Tabelle 25: Ergebnisse PCR <i>S. epidermidis</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten	

.....	67
Tabelle 26: Ergebnisse Bact/ALERT <i>S. epidermidis</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	68
Tabelle 27: Ergebnisse Bactiflow <i>S. epidermidis</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts.....	68
Tabelle 28: Ergebnisse PCR <i>S. epidermidis</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten	69
Tabelle 29: Ergebnisse Bact/ALERT <i>S. epidermidis</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	69
Tabelle 30: Ergebnisse Bactiflow <i>S. pyogenes</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Counts.....	70
Tabelle 31: Ergebnisse PCR <i>S. pyogenes</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten.....	70
Tabelle 32: Ergebnisse Bact/ALERT <i>S. pyogenes</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	71
Tabelle 33: Ergebnisse Bactiflow <i>S. pyogenes</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts	71
Tabelle 34: Ergebnisse PCR <i>S. pyogenes</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten..	72
Tabelle 35: Ergebnisse Bact/ALERT <i>S. pyogenes</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	72
Tabelle 36: Ergebnisse Bactiflow <i>S. pyogenes</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts	73
Tabelle 37: Ergebnisse PCR <i>S. pyogenes</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten	73
Tabelle 38: Ergebnisse Bact/ALERT <i>S. pyogenes</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	74
Tabelle 39: Ergebnisse Bactiflow <i>B. cereus</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Counts	75
Tabelle 40: Ergebnisse PCR <i>B. cereus</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten	75
Tabelle 41: Ergebnisse Bact/ALERT <i>B. cereus</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	76
Tabelle 42: Ergebnisse Bactiflow <i>B. cereus</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts....	76
Tabelle 43: Ergebnisse PCR <i>B. cereus</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten	77
Tabelle 44: Ergebnisse Bact/ALERT <i>B. cereus</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	77

Tabelle 45: Ergebnisse Bactiflow <i>B. cereus</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts..	78
Tabelle 46: Ergebnisse PCR <i>B. cereus</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten	78
Tabelle 47: Ergebnisse BacT/ALERT <i>B. cereus</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	79
Tabelle 48: Ergebnisse Bactiflow <i>E. coli</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Counts.....	79
Tabelle 49: Ergebnisse PCR <i>E. coli</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten.....	80
Tabelle 50: Ergebnisse BacT/ALERT <i>E. coli</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	80
Tabelle 51: Ergebnisse Bactiflow <i>E. coli</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts.....	81
Tabelle 52: Ergebnisse PCR <i>E. coli</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten.....	81
Tabelle 53: Ergebnisse BacT/ALERT <i>E. coli</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	82
Tabelle 54: Ergebnisse Bactiflow <i>E. coli</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts.....	82
Tabelle 55: Ergebnisse PCR <i>E. coli</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten.....	83
Tabelle 56: Ergebnisse BacT/ALERT <i>E. coli</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	83
Tabelle 57: Ergebnisse Bactiflow <i>K. pneumoniae</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Counts	84
Tabelle 58: Ergebnisse PCR <i>K. pneumoniae</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten ..	84
Tabelle 59: Ergebnisse BacT/ALERT <i>K. pneumoniae</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	85
Tabelle 60: Ergebnisse Bactiflow <i>K. pneumoniae</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts.....	85
Tabelle 61: Ergebnisse PCR <i>K. pneumoniae</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten	86
Tabelle 62: Ergebnisse BacT/ALERT <i>K. pneumoniae</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	86
Tabelle 63: Ergebnisse Bactiflow <i>K. pneumoniae</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts.....	87
Tabelle 64: Ergebnisse PCR <i>K. pneumoniae</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten.....	87
Tabelle 65: Ergebnisse BacT/ALERT <i>K. pneumoniae</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in	

Stunden (aerobe Flaschen)	88
Tabelle 66: Ergebnisse Bactiflow <i>S. marcescens</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Counts ..	88
Tabelle 67: Ergebnisse PCR <i>S. marcescens</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten	89
Tabelle 68: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. marcescens</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	89
Tabelle 69: Ergebnisse Bactiflow <i>S. marcescens</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts	90
Tabelle 70: Ergebnisse PCR <i>S. marcescens</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten	90
Tabelle 71: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. marcescens</i> 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	91
Tabelle 72: Ergebnisse Bactiflow <i>S. marcescens</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts.....	91
Tabelle 73: Ergebnisse PCR <i>S. marcescens</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts...	92
Tabelle 74: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. marcescens</i> 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	92
Tabelle 75: Ergebnisse Bactiflow <i>S. aureus</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts ..	95
Tabelle 76: Ergebnisse PCR <i>S. aureus</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten....	95
Tabelle 77: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. aureus</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	95
Tabelle 78: Ergebnisse Bactiflow <i>S. aureus</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	96
Tabelle 79: Ergebnisse PCR <i>S. aureus</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten	96
Tabelle 80: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. aureus</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	96
Tabelle 81: Ergebnisse Bactiflow <i>S. aureus</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	97
Tabelle 82: : Ergebnisse PCR <i>S. aureus</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	97
Tabelle 83: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. aureus</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in	

Stunden (aerobe Flaschen)	97
Tabelle 84: Ergebnisse Bactiflow <i>S. epidermidis</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts.....	98
Tabelle 85: : Ergebnisse PCR <i>S. epidermidis</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	98
Tabelle 86: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. epidermidis</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	98
Tabelle 87: Ergebnisse Bactiflow <i>S. epidermidis</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	99
Tabelle 88: :Ergebnisse PCR <i>S. epidermidis</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	99
Tabelle 89: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. epidermidis</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	99
Tabelle 90: Ergebnisse Bactiflow <i>S. epidermidis</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	100
Tabelle 91: Ergebnisse PCR <i>S. epidermidis</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	100
Tabelle 92: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. epidermidis</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	100
Tabelle 93: Ergebnisse Bactiflow <i>S. pyogenes</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts	101
Tabelle 94: Ergebnisse PCR <i>S. pyogenes</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten	101
Tabelle 95: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. pyogenes</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	101
Tabelle 96: Ergebnisse Bactiflow <i>S. pyogenes</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	102
Tabelle 97:Ergebnisse PCR <i>S. pyogenes</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten	102
Tabelle 98: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. pyogenes</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	102

Tabelle 99: Ergebnisse Bactiflow <i>S. pyogenes</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	103
Tabelle 100: Ergebnisse PCR <i>S. pyogenes</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	103
Tabelle 101: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. pyogenes</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	103
Tabelle 102: Ergebnisse Bactiflow <i>B. cereus</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts	104
Tabelle 103: Ergebnisse PCR <i>B. cereus</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten	104
Tabelle 104: Ergebnisse BacT/ALERT <i>B. cereus</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	104
Tabelle 105: Ergebnisse Bactiflow <i>B. cereus</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	105
Tabelle 106: Ergebnisse PCR <i>B. cereus</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten	105
Tabelle 107: Ergebnisse BacT/ALERT <i>B. cereus</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	105
Tabelle 108: Ergebnisse Bactiflow <i>B. cereus</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	106
Tabelle 109: Ergebnisse PCR <i>B. cereus</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	106
Tabelle 110: Ergebnisse BacT/ALERT <i>B. cereus</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	106
Tabelle 111: Ergebnisse Bactiflow <i>E. coli</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts ..	107
Tabelle 112: Ergebnisse PCR <i>E. coli</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten	107
Tabelle 113: Ergebnisse BacT/ALERT <i>E. coli</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	107
Tabelle 114: Ergebnisse Bactiflow <i>E. coli</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts	108
Tabelle 115: Ergebnisse PCR <i>E. coli</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten	108
Tabelle 116: Ergebnisse BacT/ALERT <i>E. coli</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in	

Stunden (aerobe Flaschen)	108
Tabelle 117: Ergebnisse Bactiflow <i>E. coli</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts	109
Tabelle 118: Ergebnisse PCR <i>E. coli</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten	109
Tabelle 119: Ergebnisse BacT/ALERT <i>E. coli</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	109
Tabelle 120: Ergebnisse Bactiflow <i>K. pneumoniae</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts.....	110
Tabelle 121: Ergebnisse PCR <i>K. pneumoniae</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	110
Tabelle 122: Ergebnisse BacT/ALERT <i>K. pneumoniae</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	110
Tabelle 123: Ergebnisse Bactiflow <i>K. pneumoniae</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	111
Tabelle 124: Ergebnisse PCR <i>K. pneumoniae</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	111
Tabelle 125: Ergebnisse BacT/ALERT <i>K. pneumoniae</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	111
Tabelle 126: Ergebnisse Bactiflow <i>K. pneumoniae</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts.....	112
Tabelle 127: Ergebnisse PCR <i>K. pneumoniae</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	112
Tabelle 128: Ergebnisse BacT/ALERT <i>K. pneumoniae</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	112
Tabelle 129: Ergebnisse Bactiflow <i>S. marcescens</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts.....	113
Tabelle 130: Ergebnisse PCR <i>S. marcescens</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten.....	113
Tabelle 131: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. marcescens</i> Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	113

Tabelle 132: Ergebnisse Bactiflow <i>S. marcescens</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts	114
Tabelle 133: Ergebnisse PCR <i>S. marcescens</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten	114
Tabelle 134: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. marcescens</i> 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	114
Tabelle 135: Ergebnisse Bactiflow <i>S. marcescens</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts	115
Tabelle 136: Ergebnisse PCR <i>S. marcescens</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten	115
Tabelle 137: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. marcescens</i> 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	115
Tabelle 138: Ergebnisse Bactiflow <i>S. epidermidis</i> Einzelmessungen Messungen Pool-TKs in Counts	118
Tabelle 139: Ergebnisse PCR <i>S. epidermidis</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten	119
Tabelle 140: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. epidermidis</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	119
Tabelle 141: Ergebnisse Bactiflow <i>S. epidermidis</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts	120
Tabelle 142: Ergebnisse PCR <i>S. epidermidis</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten	120
Tabelle 143: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. epidermidis</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	121
Tabelle 144: Ergebnisse Bactiflow <i>S. epidermidis</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts	121
Tabelle 145: Ergebnisse PCR <i>S. epidermidis</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten	122
Tabelle 146: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. epidermidis</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	122
Tabelle 147: Ergebnisse Bactiflow <i>B. cereus</i> Einzelmessungen Messungen Pool-TKs in Counts	123

Tabelle 148: Ergebnisse PCR <i>B. cereus</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten	123
Tabelle 149: Ergebnisse Bact/ALERT <i>B. cereus</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	124
Tabelle 150: Ergebnisse Bactiflow <i>B. cereus</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts	124
Tabelle 151: Ergebnisse PCR <i>B. cereus</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten...	125
Tabelle 152: Ergebnisse Bact/ALERT <i>B. cereus</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen).....	125
Tabelle 153: Ergebnisse Bactiflow <i>B. cereus</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts	126
Tabelle 154: Ergebnisse PCR <i>B. cereus</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten.	126
Tabelle 155: Ergebnisse Bact/ALERT <i>B. cereus</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	127
Tabelle 156: Ergebnisse Bactiflow <i>K. pneumoniae</i> Einzelmessungen Messungen Pool-TKs in Counts	127
Tabelle 157: Ergebnisse PCR <i>K. pneumoniae</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten	128
Tabelle 158: Ergebnisse Bact/ALERT <i>K. pneumoniae</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	128
Tabelle 159: Ergebnisse Bactiflow <i>K. pneumoniae</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts.....	129
Tabelle 160: Ergebnisse PCR <i>K. pneumoniae</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten.....	129
Tabelle 161: Ergebnisse Bact/ALERT <i>K. pneumoniae</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	130
Tabelle 162: Ergebnisse Bactiflow <i>K. pneumoniae</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts.....	130
Tabelle 163: Ergebnisse PCR <i>K. pneumoniae</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten.....	131
Tabelle 164: Ergebnisse Bact/ALERT <i>K. pneumoniae</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	131
Tabelle 165: Ergebnisse Bactiflow <i>S. marcescens</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Counts	

.....	132
Tabelle 166: Ergebnisse PCR <i>S. marcescens</i> Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten	132
Tabelle 167: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. marcescens</i> Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	133
Tabelle 168: Ergebnisse Bactiflow <i>S. marcescens</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts.....	133
Tabelle 169: Ergebnisse PCR <i>S. marcescens</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten	134
Tabelle 170: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. marcescens</i> 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	134
Tabelle 171: Ergebnisse Bactiflow <i>S. marcescens</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts.....	135
Tabelle 172: Ergebnisse PCR <i>S. marcescens</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in CT- Werten.....	135
Tabelle 173: Ergebnisse BacT/ALERT <i>S. marcescens</i> 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)	136
Tabelle 174: Durch Bactiflow detektierte Bakterienspezies.....	139

III Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
AABB	American Association of Blood Banks
ABO	Blutgruppe des ABO Systems
Ak	Antikörper
AK	Arbeitskreis
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen
BÄK	Bundesärztekammer
BPA	BacT/ALERT-Probe aerob
BPN	BacT/ALERT-Probe anaerob
B. cereus	Bacillus cereus
CAPA	Corrective and preventive action
CCI	Corrected-Count-Increment
CFU	Colony-Forming-Units
CMV	Cytomegalie-Virus
DNA	Desrybonuclein-acid
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
E.coli	Escheria Coli
EK	Erythrozytenkonzentrate
EU	Europäische Union
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FMEA	Failure Mode and Effects Analysis
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G-CSF	Granylocyte- Colony Stimulating Factor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
Gy	Gray
HAV	Hepatitis A
HBV	Hepatitis B
HCl	Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalie-Virus

HCV	Hepatitis C
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus-1
HIV-2	Humanes Immundefizienz-Virus-2
HLA	Human Leukozyte Antigen
HLP	Hyperlipoproteinämie
HNA	Human Neutrophil Antigen
HPA	Human platelet antigen
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IgA	Immunglobuli A
INH	International Haemovigilance Network
k	Blutgruppen-Antigen Cellano
K	Blutgruppen-Antigen Kell
KHK	Koronare Herzkrankheit
K. pneumonia	Klebsiella pneumoniae
LPS	Lipopolysaccharide
MRE	Multiresistente Erreger
MRGN	Multiresistente gram-negative (Bakterien)
NAT	Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken
Parvo B19	Parvovirus B19
PBM	Patient Blood Management
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PGASSM	Additivlösung, die in 100 ml folgendes enthält: Glukose-Monohydrat 940 mg, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 125,5 mg, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 143,2 mg, Adenin 19,4 mg, Guanodin 40,8 mg, Mannitol 1000 mg, Natriumchlorid 421 mg, Aqua ad iniectionem ad 100 ml
PI	Pathogeninaktivierung
PMN	Periphere Mononukleäre Neutrophile Zellen
PTP	post-transfusionelle Purpura

RNA	Ribonuclein-acid
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. marcescens	Serratia marcescens
S. pyogenes	Streptococcus pyogenes
TACO	Transfusionsassoziiertes circulatorisches Overload
TBBI	Transfusionsbasierte Bakterielle Infektion
TK	Thrombozytenkonzentrat
TRALI	Transfusionsassoziierte Lungeninsuffizienz
TRIM	Transfusionsassoziierte Immunmodulation
TSCD	Tissue steril connecting device
TTP	Thrombozytisch-thrombopenische Purpura
WNV	West-NIL-Virus

Die Autorin verwendet in ihrer Ausarbeitung aus Gründen der besseren Lesbarkeit ausschließlich die männliche Form der Geschlechterbezeichnung. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter, sofern nicht explizit andere Angaben erfolgen.

1 EINLEITUNG

Die DRK Blutspendedienste sind stetig darauf aus, die Transfusionssicherheit für Patienten nach neuesten Erkenntnissen von Wissenschaft und Forschung auszubauen. Forschungen finden in Deutschland hauptsächlich beim DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen sowie dem DRK Blutspendedienst Nord-Ost statt. Hierbei müssen vor allem zwei wichtige Aspekte bedacht werden: zum einen der Gesundheitszustand des Empfängers und zum anderen der Gesundheitszustand des Spenders.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich im Wesentlichen mit dem Part der Spende und untersucht die Sicherheit der Blutprodukte in Bezug auf eine bakterielle Kontamination. Der Schwerpunkt wird dabei vor allem auf die Thrombozytenkonzentrate gelegt, da diese bei Raumtemperatur gelagert werden und somit für viele Bakterienstämme gute Wachstumsbedingungen aufweisen.¹ Das bakterielle Infektionsrisiko wird gegenwärtig 10 bis 100fach höher bewertet als das verbleibende Infektionsrisiko für virale Infektionen.²

Im Gegensatz zu Viren, die sich als unvollständige Mikroorganismen nach der Entnahme des Blutes aus dem menschlichen Organismus nicht weiter vermehren können, sind Bakterien, unabhängig von anderen Zellen in den Blutprodukten, in der Lage, sich selbstständig zu vermehren.³ Die Vermehrungsfähigkeit von Bakterien in Blutprodukten ist abhängig von dem charakteristischen Verhalten der Bakterien und der Lagerungstemperatur. Optimale Bedingung für die meisten Bakterien stellt eine Lagerung bei Raumtemperatur dar. Vereinzelt Bakterien, wie zum Beispiel *Yersinia enterocolitica*^{4,5} oder Listerien^{6,7}, können jedoch auch bei Kühlschranktemperaturen wachsen.

1.1 Blutspende und Herstellung von Thrombozytenkonzentraten

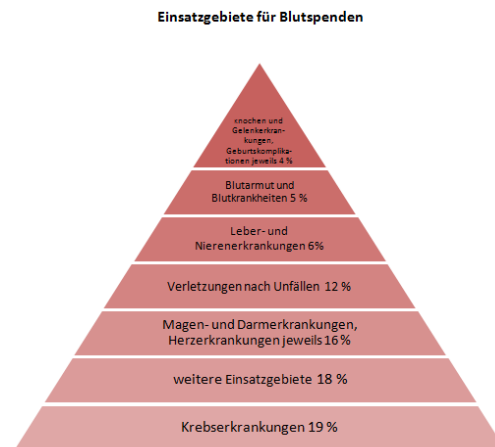


Abbildung 1: Einsatzgebiete für Blutspenden

Obige Abbildung zeigt die generellen Einsatzgebiete von Blutspenden. Das aktuelle Augenmerk liegt im Folgenden auf den Thrombozytenkonzentraten.

Diese werden als Pool aus vier bis sechs Vollblutspenden oder durch eine Apherese hergestellt. Ein Thrombozytenaggregat muss mindestens 2×10^{11} Thrombozyten enthalten.⁸

Die Thrombozyten befinden sich entweder in 300 ml Plasma oder Additivlösung mit circa 30-prozentigem Plasmaanteil und einer geringen Restmenge von Leukozyten und Erythrozyten.⁹

Das Paul-Ehrlich-Institut fordert nach mehreren Diskussionen mit dem Arbeitskreis Blut und dessen Fachkreisen seit 01.10.2001 eine Restmenge von Leukozyten nach In-Line-Filtration $< 1,0 \times 10^6$ pro Beutel.¹⁰

1.1.1 Durchführung und Verarbeitung der Vollblutspende

Um die Risikopunkte für die bakterielle Kontamination eines Spendenbeutels aufdecken zu können, ist es von Bedeutung, sich noch einmal den Ablauf einer Spende vor Augen zu führen.

Die Blutspende wird von den Spendern in der Regel als Vollblutspende abgegeben. Spenden darf jeder gesunde Erwachsene mit einem Körpergewicht über 50 kg im Alter von 18 bis einschließlich 73 Jahren. Erstspender kann man bis zum 65. Geburtstag

werden. Vollblut dürfen Männer bis zu sechs und Frauen bis zu vier Mal im Jahr spenden.

Zunächst muss der Spender einen Spenderfragenbogen ausfüllen. Dieser soll Aufschluss über Risikofaktoren für eine etwaige Kontamination der Spende, mit für den Empfänger gesundheitsschädlichen Substanzen wie Viren, Bakterien oder Chemotherapeutika, aufdecken. Das bakterielle Kontaminationsrisiko soll beispielsweise durch einen vorübergehenden Spendenausschluss nach medizinischen Eingriffen mit hohem Bakteriämiepotenzial wie Zahnbehandlung oder Endoskopie gesenkt werden. Außerdem hat der Spender hier die Möglichkeit anzukreuzen, dass er die Verwendung seiner Spende nicht möchte (vertraulicher Selbstausschluss).

Auf das Ausfüllen des Fragebogens folgt eine ärztliche Untersuchung, um die Spendetauglichkeit zu belegen und eine Gefährdung des Spenders durch seine Spende möglichst auszuschließen.

Bei der eigentlichen Blutspende wird schließlich 0,5 l Blut in ein geschlossenes Beutelsystem, welches zusätzlich einen Stabilisator (100 ml Additive Lösung PAGGS-Mannitol enthalten: Glukose-Monohydrat 940 mg Natriumdihydrogenphosphat - Dihydrat 125,5 mg Dinatriumhydrogenphosphat -Dihydrat 143,2 mg Adenin 19,4 mg Guanosin 40,8 mg Mannitol 1000 mg Natriumchlorid 421 mg Aqua ad iniectionem ad 100 ml) enthält, abgenommen. Die ersten 30 bis 50 ml gehen dabei in ein spezielles Reservoir zum sogenannten 'predonation sampling' (eingeführt 2002 per Votum 27 des Arbeitskreises Blut)¹¹. Durch die Einführung des „predonation samplings“ konnte das bakterielle Risiko, vor allem durch das Abfangen von Hautkeimen, um ca. 50% reduziert werden.^{12, 12}

Die Vollblutentnahmen werden durch den Blutspendedienst in seine Bestandteile Erythrozyten, Plasma und Thrombozyten aufgetrennt. Hiervon können dann sogenannte Thrombozyten-Pool-Produkte aus vier bis sechs Spenden hergestellt werden. Zunächst werden die Spendenbeutel zentrifugiert. Plasma und Erythrozyten werden mit Hilfe von Compomaten (G5, Fresenius Medical, Bad Homburg Deutschland) abgepresst. Übrig bleibt danach der sogenannte Buffy coat mit Thrombozyten, Leukozyten und Resten von Plasma und Erythrozyten.

Diese Auftrennung in die einzelnen Komponenten soll innerhalb von acht Stunden begonnen werden. Eine Auftrennung ist bis zu 24 Stunden nach der Blutspende möglich, wenn die Spende nach Ablauf der acht Stunden entweder bei $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ oder 18 °C bis 24 °C gelagert wird.¹³

Vier bis sechs Buffy coats werden blutgruppenidentisch (bezogen auf das ABO und Rhesus Blutgruppensystem) mit Hilfe des TSCD Verfahren steril miteinander verbunden und anschließend erneut per Softspin-Zentrifugation zentrifugiert (296 x g). Leukozyten haben nur einen sehr geringen Anteil an der Vollblutspende und werden aus den übrigen Komponenten vor Freigabe der Blutprodukte herausfiltriert, um unnötige und lebensgefährliche Immunreaktionen beim Empfänger zu vermeiden, die auch als Graft-versus-host Erkrankungen (GvHD) beschrieben werden.^{9, 14, 15}

Im Falle einer benötigten Leukozytenspende werden sie mittels Apherese gewonnen. Übrig bleiben die kernlosen Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt. Sie sind für die Blutgerinnung und somit auch den Wundverschluss verantwortlich. Bei einem Mangel kann es zu starken, unkontrollierten Blutungen kommen. Auf der anderen Seite kann eine Fehlfunktion zu Gefäßverschlüssen durch Thrombenbildung führen. Aktiviert werden Thrombozyten über einen intrinsischen und/ oder einen extrinsischen Weg mittels einer Kaskade von Gerinnungsfaktoren des Plasmas.

Steriles Vorgehen und ständige Qualitätskontrollen sollen eine bakterielle Kontamination der Spende während dieser Prozesse verhindern.

1.1.2 Durchführung von Apheresen

Bei einer Apherese unterzieht sich der Spender einer besonderen Art der Blutspende. Hier wird das Blut nicht in einen Beutel, sondern in eine Apheresemaschine und von dieser wieder in den Spender geleitet. In der Maschine werden nur die gewünschten Blutbestandteile herauszentrifugiert, zum Beispiel Thrombozyten. Das Spenderblut muss hierfür die Maschine mehrfach durchlaufen, wodurch die Apheresespende zeitaufwendiger ist, als eine Vollblutspende. Eine Thrombozytenapherese dauert beispielsweise circa zwei Stunden, eine Plasmapherese circa 40 Minuten.

Der Vorteil ist die Möglichkeit einer gezielten Spende für einen bestimmten Patienten, bei welchem beispielsweise eine genaue Übereinstimmung der Antigenkonstellation

aufgrund vorhandener Alloantikörper sehr wichtig ist. Dies ist oft bei polytransfunden Patienten der Fall, bei welchen sich die Transfusion von Pool-TKs in der Regel als sehr schwierig erweist, da es sich hierbei um Produkte mit dem Inhalt von Thrombozytenfraktionen aus vier bis sechs verschiedenen Vollblutspenden handelt. Hierdurch ist die Antigenkonstellation sehr variabel, was für den Großteil der übrigen Empfänger jedoch keinerlei Nachteile mit sich bringt. Das Blut polytransfundierter Patienten enthält jedoch häufig eine Vielzahl unterschiedlicher Antikörper, die das Risiko unerwünschter Transfusionsreaktionen sowie einer Immunisierung erhöhen. Bei Refraktärzuständen trotz Transfusion sollte daher eine Bestimmung der Antigene und Antikörper erfolgen und bei starken Reaktionen auf speziell für diesen Patienten ausgewählte Apheresespender zurückgegriffen werden.^{9, 16}

Außerdem ist die Apherese die bevorzugte Spendenquelle für Leukozytenpräparate, da bei einer Vollblutspende aufgrund des geringen Leukozytenanteils ein großer Pool aus vielen verschiedenen Spenden hergestellt werden müsste. Hierbei wäre die Gefahr der Empfängerreaktion aufgrund der großen Variabilität von Antigenen sehr groß. Daher werden diese Transfusionen nur von einem einzigen Spender mittels Apherese nach vorheriger Injektion von Granulozyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) getätigt. Transfundiert werden nur die Granulozyten.¹⁷

Generell sind die medizinischen Untersuchungen der Apheresespender aufwendiger und umfangreicher als die der Vollblutspender. Sie umfassen beispielsweise Serumspiegel von IgG und Gesamteiweiß sowie die Leukozyten-, Erythrozyten-, Thrombozytenanzahl und das MCV. Des Weiteren richtet sich die erlaubte Volumenmenge nach dem Körpergewicht. Nicht jeder Vollblutspender ist daher automatisch auch für Apheresespenden geeignet.

Im Risiko der bakteriellen Kontamination unterscheiden die beiden Verfahren sich nicht.¹⁸ Eine Risikoerhöhung durch die höhere Spenderanzahl (vier bis sechs) sowie die Schritte der Aufbereitung der Vollblutspende und die möglicherweise damit verbundene höhere Wahrscheinlichkeit für Kontamination der Spende durch Haut- oder

Umgebungskeime wird diskutiert. „Bezogen auf die ermittelte Meldehäufigkeit findet sich kein relevanter Unterschied zwischen den beiden Herstellungsmethoden für Thrombozytenkonzentrate.“¹⁹ Schrezenmeier et al. wies in seiner Studie 2006 sogar nach, dass die bakterielle Kontamination der Pool-TKs etwas geringer ist als bei Apheresen. Als Ursache wird vermutet, dass die aufgrund des Herstellungsprozesses initial noch bis zur softspin-Zentrifugation vorhandenen Leukozyten ein Teil der Bakterien phagozytiert.¹⁸

1.2 Lagerung und Haltbarkeit von Blutprodukten

Nach der Richtlinie Hämotherapie Gesamtnovelle 2017 der BÄK mit Erratum von 2019 werden Blutprodukte wie folgt gelagert:

Die Lagerung von *Erythrozytenkonzentraten* erfolgt bei $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Die Haltbarkeit beträgt je nach Herstellungsverfahren und Additivlösung 28 - 49 Tage für normale Konzentrate. (Beim DRK Blutspendedienst in Frankfurt sind es beispielsweise 42 Tage bei einer PAGGSM-Lösung.)

Die Haltbarkeit kann durch Kryokonservierung, die bis zum Tag sieben nach der Spende erfolgen muss, verlängert werden. Das Produkt ist dann bei -80°C bis zu 30 Jahre haltbar und darf frühestens vier Monate nach Kryokonservierung eingesetzt werden. Genutzt wird dieses Verfahren vor allem bei seltenen Blutgruppen oder Antikörperkonstellationen.

Nach Auftauen ist das Erythrozytenkonzentrat in der Regel zwölf Stunden haltbar.²⁰

Das *Blutplasma* soll innerhalb von 24 Stunden nach der Blutspende als Frischplasma eingefroren werden. Hier soll das Produkt innerhalb einer Stunde eine Lagerungstemperatur von -30°C (Toleranz $+3^{\circ}\text{C}$) erreichen, lyophilisiertes Plasma $2 - 25^{\circ}\text{C}$. Das Plasma darf frühestens vier Monate nach der Blutspende transfundiert werden. Jedoch nur dann, wenn vorher noch eine Blutspende erfolgte, die ebenfalls negative Screeningtests ergab.

Die Haltbarkeit bei oben aufgeführter Lagerung beträgt bei tiefgefrorenem Plasma je nach Herstellung bis zu 36 Monate (beim DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen 24 Monate) und bei lyophilisiertem Plasma 15 Monate.²⁰

Granulozytenkonzentrate können nur durch Apherese bei einem Spender nach Konditionierung beispielsweise mittels G-CSF entnommen werden. Danach sind sie innerhalb von 24h zu transfundieren und bei zur Transfusion bei $+ 22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ zu lagern. Vor der Transfusion ist eine γ -Bestrahlung mit einer mittleren Dosis von 30 Gy durchzuführen, wobei an keiner Stelle des Produktes weniger als 25 Gy ankommen dürfen.²⁰

Thrombozytenkonzentrate sollen bei einer Temperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Hierbei ist eine ständige Agitation der Produkte notwendig, um die physiologische Agglutinationsfähigkeit aufrecht zu erhalten. Dies erfolgt in der Regel durch sogenannte Agitatoren.

Die Haltbarkeit beträgt maximal vier Tage, errechnet ab 24 Uhr des Entnahmetages. Nach einer Testung der Thrombozytenkonzentrate auf eine Bakterienkontamination kann die maximale Haltbarkeit auf fünf Tage erhöht werden. Weiterhin kann die Haltbarkeit durch eine Pathogeninaktivierung (PI) per UVA-Strahlung auf fünf Tage verlängert werden. Laut einer Stellungnahme des Arbeitskreises Blut von seiner 85. Sitzung im April 2018 ist neben den auf UVA-Strahlung basierenden Systemen Mirasol und Intercept außerdem noch die Pathogeninaktivierung mittels UVC (Theraflex) CE-zertifiziert. Die Pathogeninaktivierung sorgt gleichzeitig für eine Leukozyteninaktivierung, wodurch eine weitere Bestrahlung zu diesem Zweck überflüssig wird.²⁰

Aus den oben genannten Lagerungsbedingungen ergeben sich die Probleme der Bakterienkontamination, mit der sich diese Arbeit befasst.

Die Temperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ stellt eine sehr gute Wachstumsbedingung für viele Mikroorganismen dar. So kann sich auch eine sehr geringe Anfangskonzentration an Bakterien in relativ kurzer Zeit stark vermehren. Im ungünstigsten Fall kann dies

aufgrund der guten Wachstumsbedingungen dazu führen, dass die Bakterien beim Empfänger eine schwere Infektion auslösen.³

Die Wahrscheinlichkeit einer transfusionsbedingten bakteriellen Infektion (TBBI) steigt mit jedem Tag an. Ab Tag fünf würde das Risiko nach dem Votum 38 des Arbeitskreises Blut aus dem Jahr 2008 den Nutzen überwiegen. Ausnahme hier ist eine vorherige Testung des Produkts auf Kontamination am Tag vier.⁹

1.3 Transfusion von Blutprodukten am Beispiel

Thrombozytenkonzentrate

Indikationen zur Transfusion können Blutungsstörungen sowie eine Thrombozytopenie sein. Die Dringlichkeit richtet sich nach dem Thrombozytenwert im Blutbild, kombiniert mit der Art der Ursache. Generell sollte eher eine zurückhaltende Transfusionsstrategie gewählt werden. Dies soll beispielsweise das Risiko transfusionsassoziierter Immunmodulationen (TRIM) verhindern und somit die Infektionsgefahr generell senken. Zu den Transfusionstriggern zählt ebenfalls auch eine akute Gerinnungsstörung.⁹

Thrombozytenaggregate können prinzipiell blutgruppeninkompatibel transfundiert werden. Da Thrombozytenkonzentrate jedoch auch immer eine Restmenge an Plasma enthalten, sollte, wenn möglich, auf eine ABO-kompatible Transfusion geachtet werden, um die Gefahr von unerwünschten Transfusionsreaktionen zu minimieren.²¹

Eine Kreuzprobe wie bei Erythrozytenprodukten ist allerdings nicht erforderlich. Dies liegt daran, dass Thrombozyten lediglich HLA Klasse I Antigene und Human platteld Antigene (HLP) als thrombozytenspezifische Antigene besitzen.^{14, 22}

ABO-Antigene sind nur geringfügig (zu circa 10%) enthalten und auch die antigen-präsentierende Plasma- und Erythrozyten- Restkonzentration ist sehr gering. Rhesus- und Kellfaktor sind auf den Thrombozyten selbst nicht ausgeprägt, können jedoch auch durch diese Restkonzentrationen von Plasma und Erythrozyten zu einer Antikörperbildung führen.^{14, 21}

Auch die Rhesusantikörper der Restfraktion an Erythrozyten und Plasma können zu einer Antikörperproduktion beim Empfänger führen. Daher sollte gerade bei Mädchen und gebärfähigen Frauen auch auf eine rhesuskompatible Transfusion geachtet werden.

Außerdem ist generell möglichst eine ABO-Kompatibilität von Empfängerblut und Spender-TK anzustreben, da bisher nicht abschließend geklärt ist, ob eine Inkompatibilität eine Immunmodulation begünstigt und somit außerdem den Abbau beschleunigt.^{23,9} Dies ist möglich aufgrund einer Minorinkompatibilität. Hierbei werden durch Plasmaresten enthaltene Isoagglutinine oder gar Isohämolytine übertragen, was „unter Umständen zu unerwünschten Wirkungen im Sinne einer hämolytischen Transfusionsreaktion führen“ kann.²⁴

Der DRK- Blutspendedienst empfiehlt daher eine generelle ABO-kompatible Transfusion für Kinder <25 kg.^{23,24}

Des Weiteren ist in manchen klinischen Situationen eine Übereinstimmung der HPA-Antigene von Empfänger und Spender erforderlich.²²

Auch eine Notwendigkeit von HLA-gematchten TKs kann laut Empfehlungsgrad 1B der Querschnittsleitlinien Hämotherapie der BÄK 2014 aufgrund einer bereits geschehenen Bildung von Alloantikörpern beim Empfänger, welche oft bei polytransfunden Patienten zu finden ist, bestehen.⁹

Erwachsenen sollte initial ein TK transfundiert werden, Kindern unter 15 kg Körpergewicht 10 bis 20 ml pro Kilogramm Körpergewicht.⁹

Für die Kontrolle des Transfusionserfolgs wird die Corrected-Count-Increment (CCI) – Formel angewandt:

(Differenz der Thrombozytenwerte vor und nach Transfusion x Körperoberfläche des Patienten in m²)/Anzahl der transfundierten Thrombozyten in 10¹¹)

Der CCI-Wert sollte nach einer Stunde über 7.500 – 10.000 liegen.²⁵

Bei einer Allergie gegen humane Plasmaproteine, welche häufig auf Anti-IgA basiert, sollten sogenannte gewaschene TKs, bei denen das Restplasma entfernt wurde, transfundiert sowie Prednisolon und Antihistaminika verabreicht werden.⁹

1.3.1 Komplikationen von Thrombozytentransfusionen

Eine Bluttransfusion stellt für die Patienten analog zu Organtransplantationen die Einbringung von Fremdantigenen dar. Daher sind stets auch immunologische

Reaktionen des Immunsystems des Patienten auf die Fremddantigene möglich. Ebenso können vorhandene Restleukozyten eine Immunreaktion gegen die Antigene des Patienten als Graft-versus-Host-Disease (GvHD) auslösen. Erstere kommen bei Thrombozytentransfusionen häufiger vor als bei Erythrozytentransfusionen.^{26, 9} Prophylaktisch können Thrombozytenaggregate zur Minimierung des Risikos einer transfusionsassoziierten GvHD vor Transfusion bei Risikogruppen mit 30 Gy bestrahlt werden, um die Restleukozyten zu inaktivieren.

Restleukozyten im Spendenpräparat können außerdem zur *Transfusionsassoziierten Lungeninsuffizienz (TRALI)* oder *febrilen nicht-hämolytischen Transfusionsreaktion (FNHTI)* beim Empfänger führen. Durch die Leukozytendepletion ist das Risiko für diese Erkrankung stark zurück gegangen.^{27, 28}

Grundsätzlich kann es bei der Thrombozytentransfusion, wie bei jeder anderen Transfusion auch, zu Verwechslungen von Produkten und/oder Empfängern kommen. Bei einer Massentransfusion ist das Hypothermierisiko und, in Abhängigkeit der kardialen Belastbarkeit, das Risiko einer *transfusionsassoziierten zirkulatorischen Überladung (TACO)* zu beachten.^{9, 29, 30}

Das Risiko einer *hämolytischen Transfusionsreaktion* ist wesentlich geringer als bei Erythrozytenkonzentraten. Als Risikopatienten zählen Neugeborene und Kinder.⁹ Die seltene *Post-Transfusions-Purpura (PTP)*, welche ähnliche Symptome wie die unter relativen Kontraindikationen genannte Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) aufweist und hauptsächlich bei weiblichen Empfängern vorkommt, kann durch eine Autoimmunreaktion nach Transfusion ausgelöst werden.^{9, 31}

Generell sollten alle neuen Symptome, die im engen zeitlichen Zusammenhang zu einer durchgeführten Transfusion stehen, erst einmal als Transfusionsreaktion gewertet und abgeklärt werden.

Bei therapierefraktären Patienten ist der Ausschluss eines nicht-immunologischen Verbrauchs anzustreben und eine Alloimmunisierung zu überprüfen. Des Weiteren wird geraten, bei der nächsten Transfusion eine Kreuzprobe durchzuführen.³²

1.3.1.1 Infektionen durch Thrombozytentransfusionen

Die von Patienten häufig gefürchtetste Transfusionskomplikation ist die Infektionsübertragung.

In den 90er Jahren sind viele an Hämophilie erkrankte Patienten durch mit HIV-1 kontaminierte Gerinnungspräparate (Faktor VIII und Faktor IX) mit dem HI-Virus oder Hepatitis B oder C infiziert worden.

Aktuell müssen nach der Richtlinie Hämotherapie der BÄK, Gesamtnovelle 2017 mit Erratum von 2019 folgende Parameter bei dem Spender untersucht werden sein³³:

Anti-HIV-1/-2-Antikörper, HIV-1-Genom (NAT), Anti-HCV-Antikörper, HCV-Genom (NAT), HBs-Antigen, Anti-HBc, Antikörper gegen *Treponema pallidum*.

Des Weiteren dürfen keine klinisch relevanten Antikörper im Antikörpersuchtest gefunden werden.

Durch oben genannte Maßnahmen handelt es sich bei der viralen Infektionsübertragung um eine sehr seltene Transfusionskomplikation. Das Restinfektionsrisiko liegt beim DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg- Hessen aktuell bei

1:360.000 für Hepatitis B,
<1:10,88 Mio für Hepatitis C
und <1: 4,3 Mio für HIV.³⁴

Hier wird die hohe Sicherheit deutscher Blutspenden deutlich.³⁵

Das vergleichsweise hohe Risiko einer Hepatitis B-Übertragung liegt an der langen Inkubationszeit dieser Virusinfektion sowie der hohen Prävalenz und Infektiösität. Das diagnostische Fenster beträgt 19 bis 26 Tagen für Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT).³⁶ Bei Hepatitis C sind es vier bis sechs Tage.³⁷

Dieses Restinfektionsrisiko wird durch einen Spenderfragebogen, welcher einige Risikokriterien wie Auslandsreisen und sexuelle Infektionsrisiken abfragt, weiter reduziert.

In besonderen Fällen wird für die Transfusion bei immunsupprimierten Patienten außerdem auch eine Untersuchung auf CMV bei den Blutprodukten durchgeführt. Thrombozytenaggregate, die nicht leukozytendepletiert wurden, können in seltenen Fällen bei CMV-seronegativen Empfängern zu einer *CMV-Infektion* führen. Daher erhalten Risikopatienten wie Immunsupprimierte oder wesentlich CMV-negative Patienten in der Regel CMV-negative Präparate.¹⁵

Aktuell wird davon ausgegangen, dass eine Leukozytendepletion den gleichen Präventionsstatus zur Verhinderung einer transfusionsassoziierten CMV-Infektion hat wie die serologische Testung.⁹

In seltenen Fällen kann es außerdem zur Übertragung verschiedener Viruserkrankungen oder Parasitosen kommen.

Eine bakterielle Infektion wird durch die Empfänger oft weniger gefürchtet. Das Risiko liegt jedoch bei 1:1412.³⁸

Im Gegensatz zu Viren stellen Bakterien kompetente Mikroorganismen dar, die sich selbstständig in den Blutprodukten vermehren können.¹

Gerade bei Thrombozytenprodukten ist vor allem durch die Lagerungstemperatur (Raumtemperatur) eine Kultivierung von Bakterien möglich. Diese kann zu einer Transfusionsbasierten Bakteriellen Infektion (TBBI)^{3, 39} und in seltenen Fällen zum Tod führen.

Schwere Septikämien sind aufgrund der Endotoxine besonders bei der Übertragung multiresistenter gram-negativer (MRGN) Bakterien gefürchtet.^{40, 41}

Die Kriterien für das Vorliegen einer TBBI sind laut International Haemovigilance Network (INH) wie folgt:

„Fieber >39°C oder ein Anstieg um 2°C innerhalb von vier Stunden, Schüttelfrost, Tachykardie, Nachweis des gleichen Bakterienstammes im Empfängerblut und der transfundierten Blutkomponente.“⁴²

In Deutschland werden alle Verdachtsfälle von schweren Transfusionsreaktionen vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) registriert und ausgewertet. 2017 gab es mit 50 gemeldeten Fällen, von denen zwei Todesfälle waren, die meisten Fälle seit 2011.

Im Juni 2016 kam es mit drei Transfusionszwischenfällen durch bakteriell kontaminierte Pool-TKs des DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen zu einer ungewöhnlichen Häufung. Zwei dieser Kontaminationen wurden in der Laufzeitverlängerung detektiert. Bei der Kontamination handelte es sich laut dem Institut für Mikrobiologie des Universitätsklinikums Frankfurt⁴²⁻⁴⁴ um die Keime *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus dysgalacticae* und *Klebsiella pneumoniae*.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die vom PEI ausgewerteten TBBI-Meldungen der letzten Jahre⁴²⁻⁴⁵:

Tabelle 1: Übersicht TBBI-Meldungen nach Jahren

Jahr	Meldungen gesamt	Gesicherter TK-Zusammenhang	Wahrscheinlicher TK-Zusammenhang	Todesfälle
2011	45	Nicht eruierbar	4	1
2012	33	Nicht eruierbar	3	0
2013	35	4	7	0
2014	36	1	6	1
2015	29	1	7	0
2016	40	0	2	1
2017	50	1	4	2
2018	42	Nicht eruierbar	3	1

Gemäß den Hämovigilanzdaten des Bundesoberbehörde (Tabelle 1) besteht nur in ca. 10% aller TBBI Meldungen ein wahrscheinlicher Zusammenhang. Von den 310 gemeldeten Verdachtsfällen kam es nur in 6 Fällen (1,93%) zu einem schwerwiegenden Verlauf mit Todesfolge. Dies unterscheidet das Restrisiko für bakterielle Infektionen von Restrisiken für virale Erkrankungen. Für den Erhalt der obigen Daten muss der behandelnde Arzt die Verschlechterung des Gesundheitszustandes seines Patienten jedoch mit der erhaltenen Blutspende in Verbindung bringen. Dies ist allerdings oft nicht der Fall.^{46, 47}

Die TBBI als unerwünschte Komplikation einer Thrombozytentransfusion und deren Vermeidung stellen den Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

Ursache der TBBI sind meist Bakterien der natürlichen Hautflora oder Umweltkeime, die auf der Haut des Spenders angesiedelt sind³⁹ und aufgrund einer unzureichenden Desinfektion zu einer Übertragung in das Blutprodukt führen können⁴⁸.

Eine Verunreinigung des Blutes während des Verarbeitungsprozesses ist theoretisch möglich, aber unwahrscheinlich, da die Herstellung in einem sterilen geschlossenen System erfolgt.

Eine gewissenhaft durchgeführte Hautdesinfektion ist zur Vermeidung dieses Übertragungsweges essentiell.¹⁹ Dies ergab bereits in den 80er Jahren eine Studie von Pucket et al. als Ergebnis, in der Hautbakteriennachweise des Spenderarms vor und nach der Hautdesinfektion verglichen wurden.⁴⁸ Einige Jahre später wurde dies 2006 noch einmal durch eine Studie von De Korte et al. thematisiert. Hier zeigte sich ein Vorteil der zweimaligen Desinfektion mit unterschiedlichen Tupfern.⁴⁹

Seitdem wird kontinuierlich weiter geforscht, um die Desinfektionsstrategie für den Spenderarm zu optimieren.

Seit 2002 ist durch das Votum 27 des Arbeitskreises Blut 2002 in Deutschland das sogenannte „predonation sampling“, bei dem die ersten 30-50 ml zunächst in ein Probenreservoir laufen, verbindlich eingeführt.¹¹ Dieses Verfahren hat das Ziel, die durch die Punktion eingebrachten Hautkeime mit dem ersten Volumenstrom in einen separaten Beutel auszulagern und damit das Vollblutprodukt vor diesen Bakterien zu schützen. Durch die Einführung konnte das bakterielle Übertragungsrisiko um circa 50% gesenkt werden^{11,12, 49}, in Zusammenschau mit einer korrekt durchgeführten Hautdesinfektion sogar um 77 %⁵⁰.

Im Jahr 2009 veröffentlichten McDonald et al. eine Studie zu verschiedenen Desinfektionsmethoden, in der die Einmaldesinfektion mittels chlorhexidine/alcohol applicator als beste Methode deklariert und daraufhin im Blutspendedienst Großbritanniens bereits ab 2006 als Goldstandard eingesetzt wurde.⁵¹

Auch eine Übertragung durch kontaminierte Entnahmematerialien ist generell möglich. Dieses Risiko lässt sich jedoch durch Schulung und Sensibilisierung der Mitarbeiter der Blutspendedienste auf steriles Arbeiten stark minimieren.

Fälle wie die Verunreinigung der Spendenbeutel durch vorheriges Anstechen zwecks Probenentnahmen, was beispielsweise 1994 in Düsseldorf zu schwerwiegenden Infektionen von Empfängern führte⁵², ist aufgrund des „predonation-sampling“, heutzutage nahezu ausgeschlossen.

In der Literatur sind außerdem einige Fälle zu finden, in denen bereits vorinfizierte Materialien, die bei der Durchführung der Blutspende verwendet wurden, mit Bakterien infiziert waren und dadurch zur bakteriellen Verunreinigung von Blutprodukten führten. Beispiele hierfür sind in Dänemark und Schweden Anfang der 90er Jahre verunreinigte⁵³,⁵⁴ oder 1995 in England defekte Spendenbeutel⁵⁵. Des Weiteren fasste die Food and Drug Administration (FDA) der USA 2012 Fälle von durch Bakterien verunreinigten Desinfektionsmitteln als Ursache von bakteriellen Infektionen zusammen.⁵⁶ Dies ist in der Transfusionsmedizin ebenfalls als Übertragungsweg denkbar.

Eine weitere Möglichkeit ist eine Übertragung durch eine symptomlose Bakteriämie des Spenders.⁵⁷ Dieser Übertragungsweg erscheint besonders wahrscheinlich, wenn die in der Spende nachgewiesenen Bakterien nicht zum Spektrum der normalen Hautflora gehören. Dies, sowie eine nicht korrekt durchgeführten Hautdesinfektion, gelten als die wahrscheinlichste Infektionsquelle.⁵⁸

Symptomatische Bakteriämien können dagegen in der Regel ausgeschlossen werden, da ein Spender, der Krankheitssymptome zeigt, entweder erst gar nicht zur Spende geht oder spätestens beim Arztgespräch von der Spende ausgeschlossen wird.⁵⁹

Eine weitere Maßnahme zur Minimierung des Risikos einer bakteriellen Übertragung ist die Einführung der Bakterientestung von Thrombozytenprodukten.

Grundsätzlich ist bei allen Kontaminationswegen vor allem die Kontamination mit aeroben Bakterien zu beachten, anaerobe Bakterien wirken oft nicht pathogen.^{57, 60} Dennoch sollten Bakterientestverfahren beide Bakterienarten nachweisen.

Neben der Immunität des Empfängers spielen auch die Anzahl, Virulenz und Art des Pathogens sowie die applizierte Menge des Blutproduktes eine entscheidende Rolle.⁶¹ In den letzten Jahren wurden außerdem weltweit in immer mehr Ländern neben Vorsorgemaßnahmen zur Verhinderung einer Kontamination der Spende bakterielle Screeningmethoden zum Nachweis von Bakterien in Blutprodukten entwickelt und in das Spendenscreening implementiert.

In Deutschland forderte der Arbeitskreis Blut 1997 in seinem Votum 16 zum ersten Mal die routinemäßige Testung von Blutprodukten bezüglich ihrer bakteriellen Kontamination.^{3, 62} In den darauffolgenden Jahren wurden diese Tests kontinuierlich weiter entwickelt.⁶²

Im Jahr 2009 hat die Bundesoberbehörde die maximale Haltbarkeit der Thrombozytenkonzentrate von fünf Tagen auf vier Tage reduziert (Votum 38 Arbeitskreis Blut), da schwerwiegende bakterielle Übertragungen vor allem bei einer Transfusion am Tag 5 beobachtet wurden. Die Reduzierung der maximalen Haltbarkeit hat auf der einen Seite die Versorgung der Krankenhäuser mit Thrombozytenkonzentraten vor allem an Feiertagen erschwert, da durch die verkürzte Haltbarkeit der Verfall an Thrombozytenkonzentraten erhöht wurde. Auf der anderen Seite wurden seit 2009 auch tödliche bakterielle Übertragungen mit vier Tage alten Thrombozytenkonzentraten beobachtet, so dass eine alleinige Reduzierung der Haltbarkeit nicht zu einer hinreichenden Sicherheit geführt hat.⁶³

Eine Routinetestung über die Kontrolle der augenscheinlichen bakteriellen Kontamination und damit einhergehende sichtbare Trübung der Thrombozytenpräparate hinaus war vor Votum 38 des AK Blut 2008 nicht vorgeschrieben. Die Einführung hat zu einer Reduktion der Bakteriämien nach TK-Transfusion um 50 % geführt.⁶⁴

In Polen, Italien, Litauen, Malta, Bulgarien und Tschechien dürfen TKs bis heute ohne vorheriges Bakterienscreening bis Tag 5 transfundiert werden.⁶⁴

Die DRK Blutspendedienste wenden Routinetestungen bereits seit 1997, zunächst mittels Kulturmethoden, am Ende der Laufzeit in der Qualitätskontrolle, an.³

Seit 2010 ist es, in Ergänzung zum Votum 38, auch möglich, ein bakterielles Screening einzuführen und bei einem negativem Untersuchungsergebnis die Haltbarkeit der Thrombozytenkonzentrate auf maximal fünf Tage zu verlängern.⁶³

BacT/ALERT entwickelte sich, im Gegensatz zu dem anfangs ebenfalls häufig genutzten, auf durch bakteriellen Stoffwechsel bedingten O₂-Abfall messenden Hämonetics eBDS-System, zwischenzeitlich zum Goldstandard und diente immer wieder als Kontrolle bei Studien zu verschiedenen Schnelltestmethoden.^{65, 66} Das BacT/ALERT-System ist ein Blutkultursystem, welches lebende Bakterien mit einer Nachweisgrenze von 1 CFU/ml über einen stoffwechselbedingten CO₂-Anstieg detektiert.⁶¹

Der Nachteil der Kulturmethode ist jedoch die relativ große Zeitspanne bis zum Ergebniserhalt.⁶¹

Ein Vorteil des Kulturverfahrens besteht darin, dass genau diese längere Zeitspanne den Bakterien die Chance gibt, in ihre exponentielle Wachstumsphase überzugehen und damit besser nachweisbar zu sein.⁶⁷

Dieser Vorteil wird jedoch mit der Einführung eines sehr sensitiven Schnelltestverfahren obsolet.⁶⁸

Bereits 2009 hatten Dreier et al. eine Studie veröffentlicht, in der sich herausstellte, dass das Bactiflow-Verfahren (Biomérieux) eine gut funktionierende Schnelltestmethode zum Bakteriennachweis in Thrombozyten darstellt.⁶⁹ Für diese Art bakterieller Schnelltestverfahren abseits der Kulturmethode war Deutschland Vorreiter in Europa.²

Die American Association of Blood Banks (AABB) hat allerdings bereits 2004 die Implementierung und Weiterentwicklung eines Bakterienscreenings für alle Thrombozytenprodukte gefordert. Nach dessen Einführung konnte das Risiko der Übertragung von Bakterien durch TKs in den darauffolgenden Jahren um 75 % reduziert werden.⁷⁰ Die Freigabe von TKs zur Transfusion nach der Anwendung des Platelet PGD-Test von `Verax Biomedical` als von der FDA zugelassene Bakterienschnelltestmethode

ist seit 2016 sogar auf bis zu sieben Tage erhöht.⁷¹ Allerdings handelt es sich hierbei um einen bakteriellen Schnelltest, der unmittelbar vor der Transfusion durchgeführt wird.

2011 wurde außerdem in Großbritannien ein bakterielles Screening von Thrombozytenprodukten implementiert⁷⁰ und dadurch die Übertragungsrate bakterieller Infektionen durch TKs bis 2015 um 90% gesenkt⁷².

Im selben Jahr wurde Bactiflow von Sireis et al. als erfolgreiche Routinemethode zur Reduktion des bakteriellen Transfusionsrisikos von TKs in Deutschland vorgestellt.²

Vollmer et al. verglichen 2012 die bakteriellen Schnelltestmethoden Bactiflow und PCR und kamen zu dem Ergebnis, dass beide Methoden eine vergleichbare diagnostische Sensitivität hatten.⁷³

Im Jahr 2013 hatten Vollmer et al. außerdem eine Studie veröffentlicht, die zeigt, dass die Bactiflow-Methode ebenfalls als bakterielles Schnelltestverfahren bei Erythrozytenprodukten genutzt werden kann.⁷⁴

Bis 2015 hat der DRK Blutspendedienst in Deutschland hauptsächlich Pooltests mittels einer eigens entwickelten inhouse realtime-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Bactiflow-Einzel-Testungen an Tag 4 die Haltbarkeit der TKs bereits von vier auf fünf Tage nach Spende verlängert.⁷⁵

Ein weiterer Meilenstein in der Vermeidung von TBBI ist die Entwicklung von Pathogeninaktivierungsmethoden, deren Testung und Routineeinsatz weltweit ebenfalls ein häufiges Thema von Forschungsarbeiten darstellt. Hier werden derzeit mit Mirasol, Intercept und Theraflex hauptsächlich drei verschiedene Verfahren getestet und zur Inaktivierung von Bakterien angewandt.⁵⁷

Aktuell wird außerdem erforscht, ob eine gekühlte bzw. gefrorene oder kryokonservierte Lagerung der TKs ebenfalls möglich wäre. Der Vorteil wäre neben der Reduktion des bakteriellen Risikos außerdem die verlängerte Haltbarkeit der TKs. Bisher zeigt sich dabei zwar eine verkürzte Halbwertszeit der Thrombozytenzirkulation nach

Transfusion, jedoch waren die gekühlten TKs dafür sehr effektiv bei der Behandlung akuter Blutungen.⁷⁶

In der vorliegenden Dissertation geht es darum, Ursachen von der Häufung der Transfusionszwischenfälle 2015 zu verstehen und die Bakterienschnelltestmethode in Deutschland zu optimieren, indem sie zeit- und ressourcensparender durchgeführt werden kann, ohne dabei Sensitivität einzubüßen. Hierzu wird die Sensitivität des Bactiflow-Gerätes als Schnelltestmethode sowie der Kulturmethode BacT/ALERT in Bezug auf die Testung von Mini-Pools aus bis zu zehn TKs mit der bisher angewandten Methode der aufwendigeren inhouse-PCR verglichen. Dabei werden sowohl Mini-Pools aus Apheresen, als auch Pool-TKs getestet. Im Anschluss werden schließlich alle drei Methode für TKs, die zuvor bei 4 °C gekühlt gelagert wurden, getestet.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, die bakterielle Sicherheit von Thrombozytenkonzentraten und somit auch die Patientensicherheit dieser Produkte zu verbessern und gleichzeitig die Ressource „Thrombozytenkonzentrat“ zu optimieren. Dies soll hauptsächlich durch die Beantwortung der Frage geschehen, ob die Bactiflow-Methode auch für Minipool-Tests geeignet ist.

Dazu durchläuft die Studie drei Phasen:

Phase 1: Beschreibung von klinischen Transfusionszwischenfällen

Die Auswertung von Kasuistiken soll das bakterielle Risiko verdeutlichen, Wachstumskinetiken analysieren und Ursachen für bakterielle Kontaminationen beschreiben.

Phase 2: Methodenvergleich

Im experimentellen Ansatz werden mit PCR, Bactiflow und BacT/ALERT drei bakterielle Schnelltestmethoden synoptisch miteinander verglichen. Dies geschieht sowohl in Bezug auf diagnostische Sensitivität für verschiedene Poolgrößen (Einzeltestung, 5er-Pool und 10er-Pool) als auch auf die Handhabbarkeit für den Routinebetrieb.

Phase 3: Transportvalidierung:

Im letzten Schritt wird die Transportstabilität der Proben validiert. Dadurch soll Bactiflow als sicheres Schnelltestverfahren für TK-Pooltests an drei Standorten für den DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen und den DRK Blutspendedienst Nord-Ost implementiert werden können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Apparaturen

Tabelle 2: Verzeichnis Apparaturen

Apheresegerät Spektra Optia Firma Terumo
BacT/ALERT der Firma Biomérieux
Bactiflow ALS der Firma Cereus
Beutelzentrifuge Rotosilenta 630 RS Firma
Blutkomponententrenngerät Compomat G5
Brutschrank
Dispenser für 6ml
Handystep
Inkubator
Kühlschrank
Lamina Airflow
Magnetrührer
Manuelle Handpresse
Pipetten
Pipettierhilfe
Platelet Agitator PFS 84 Firma Helmer
Realtime Cicle
Realtime-PCR-Gerät ABI Prism 7500 Applied
Schneidegerät
Schüttler
Schweißgeräte
Ständer für Reagenzien
TSCD-Gerät Terumo
Waage
Wecker
Zentrifugen Hereus Multifuge 3 SR

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verzeichnis Verbrauchsmaterialien

1 ml Spritzen 1 ml und 10 ml
Abwurfbox
Alufolie
Bakterienstämme
Blutagarplatten
Blutkulturflaschen BacT/ALERT aerob und anaerob
ChemFilter 25 und 17
Desinfektionsspray Bacillol
Distritips 5 und 12,5 ml
Druckerpapier
Edding
Einmalhandschuhe
Filter 5,28 μm
Flächendesinfektionsmittel
Kanülen
Magnetschiffchen
NaCl 0,9%
Pipettenspitzen gestopft 1ml; 50, 25 und 20 μl
Reagenzgläser
Sterile Gefäße 60 ml
Sterile Röhrchen mit Schlauchsegment für Routine Probenziehung
Stopfen mit Injektionshilfe
Stopper 20 ml
TK-Beutel
Tubes 20 ml

2.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme

<i>Bacillus cereus</i>	Biomérieux 413843/ NCTC 7464
<i>Escherichia coli</i>	PEI-B-P-19-02-01
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PEI-B-P-08-02-01
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 43862
<i>Staphylococcus aureus</i>	PEI-B-P-23
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PEI-B-P-06-02-01
<i>Streptococcus pyogenes</i>	PEI-B-P-20-02-01

2.1.4 Reagenzien Bactiflow

Tabelle 5: Reagenzienverzeichnis Bactiflow

Standard G : Kalibrator
ChemSol S: Systemflüssigkeit
ChemSol A7: Lösungspuffer
ChemSol B24: Markierungspuffer
ChemChrome V23: Färbesubstrat (CAVE: Lagerung bei 4-8 °C)
CS26A: blaue Gegenfärbung (CAVE: Lagerung bei 4-8°C)
CSR6: Reduktionsmittel
Diluent R: Reduktionslösung
Cleaning 3: Reinigungsflüssigkeit
Cleaning 5: Spülflüssigkeit
Diluent M: Reagenz für Enzymgemisch
M1: Pulver für Enzymgemisch
ChemSol M2: Reagenz für Enzymgemisch (CAVE: Lagerung bei – 20°C)
ChemSol M3: Reagenz für Enzymgemisch
Isored: Öl zum Überschichten der Reduktionslösung
Antifoam (30 ml): Schaumreduktion im Wasserbehälter

2.1.5 Zubehör PCR

Tabelle 6: 2 x QuantiTect Multiplex PCR-Mastermix

Produkt	2 x QuantiTect Multiplex PCR-Mastermix
Kennzeichnung	QTMP
Lieferant	Qiagen
Katalognr. Lieferant	204545/204745
Inhaltsstoffe	<ul style="list-style-type: none"> • optimierter PCR-Puffer mit 11 mM MgCl₂ • HotStarTaq DNA Polymerase (rekombinierte 94 kDA DNA Polymerase isoliert aus <i>Thermus aquaticus</i> und kloniert in <i>E.coli.</i>) • dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP) –ultrapur • ROX (passiver Referenzfluoreszenzfarbstoff) • RNasefreies Wasser-PCR-grade

Tabelle 7: PCR-Materialien Primer und Sonden

Produkt	Sense- Primer BAK	Antisense- Primer BAK	Sense- Primer IC	Antisense- Primer IC	BAK- Sonde	IC-Sonde
Bezeichnung	16s1	16s2	P1b	P2	16s3	P5
Lieferant	variabel	variabel	variabel	variabel	variabel	ABI
Katalognr. Lieferant	Online- Bestellung	Online- Bestellung	Online- Bestellung	Online- Bestellung	Online- Bestellung	Online- Bestellung
Inhaltsstoffe	Oligo- nukleotid	Oligo- nukleotid	Oligo- nukleotid	Oligo- nukleotid	Oligo- nukleotid	Oligo- nukleotid
Sequenz	5' ATA CCC TGG TAG TCC ACG C	5' ACA ACA CGA GCT GAC GAC	5' CAT GGA CAG TTA TCT GAC CAC	5' CAA CAT AGT TAG TAC CGG GTA GTT G	5' CAC AAG CGG TGG AGC ATG TGG	5' ACG ACG GAC CAC ACT GAC CAG TCA
Fluoreszenz- farbstoffe	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	5`FAM 3`TAMRA	5`VIC 3`TAMRA
Aufreinigung	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC

Tabelle 8: PCR-Materialien Enzyme

Produkt	Baseline-ZERO DNase
Kennzeichnung	DNase
Lieferant	Epicentre / Biozym
Katalognr. Lieferant	170005 (DB0715K)
Inhaltsstoffe	Desoxyribonuklease
Konzentration	1 U/ µl

Tabelle 9: PCR-Materialien Sonstiges

Produkt	nukleasefreies Wasser
Kennzeichnung	Herstellerlabel
Lieferant	variabel
Katalognr. Lieferant	variabel
Inhaltsstoffe	nukleasefreies Wasser
Konzentration	n.a.

Interne Kontrolle = BAK-IC

DNA-Oligonukleotid als nicht-kompetitive Interne Kontrolle mit Sequenzen komplementär zu Oligonukleotidprimern P1b und P2 sowie Oligonukleotidsonde P5

Tabelle 10: PCR-Materialien Interne Kontrolle

Produkt	Interne Kontrolle	TE-Puffer
Kennzeichnung	BAK-IC	TE-Puffer
Hersteller/Lieferant	BSD BaWüHe	Fa. Sigma-Aldrich
Katalognr.	n.a.	T9285
Stocklösung Lotnr.	BAK-IC (P-IC III)	variabel
Inhaltsstoffe	Oligonucleotid	Tris-EDTA-Puffer
Sequenz	5´ - ATG GAA ATG GCC CGA CGG CCAA AGT CAT GGA CAG TTA TCT GAC CAC CCC CAT GCC TTA TCA ACG ACG GAC CAC ACT GAC CAG TCA AAG AGG AGA TTA CGT CAT AAT AGT AGT GAA GAC TTA CAC AAG CCT GGG CAA GTT AGC GTA	

	CAA CTA CCC GGT ACT AAC TAT GTT G GT ATG CTA GGT AGC CTG A - 3'	
Konz. Stocklösung	3,01 x 10 ¹⁰ Kopien/ μ l	100 fach
Konz. Aliquot	3,56 x 10 ⁷ Kopien/ μ l	n.a.

Positivkontrolle = BAK-PK- POS

Tabelle 11: PCR-Materialien Positivkontrolle

Produkt	Positivkontrollen
Kennzeichnung	BAK-PK- POS
Hersteller	BSD Baden-Württemberg-Hessen
Inhaltsstoffe	Klebsiella Pneumoniae
Bakterienstamm	PEI-B-08-09 (7,58 x 10 ⁷ CFU/ml)
Konz. der Stocklösung	variabel
Konz Aliquot	4,0 x 10 ⁶ CFU/ml

2.2 Methoden

Die Verwendung der Spenden war über den Spenderfragebogen rechtlich abgedeckt. Hierin stimmen die Spender einer Verwendung ihrer Spende zu Forschungszwecken ausdrücklich zu. Für die Durchführung der Studie wurden außerdem größtenteils TKs verwendet, die aus verschiedenen, die Studie nicht beeinflussenden, Gründen nicht zur Transfusion freigegeben werden konnten.

Bis auf den Studienteil der Untersuchung von stattgefundenen Transfusionszwischenfällen war eine Rückverfolgung der Spende bis zum Spender nicht möglich, da die Codes der Spendenbeutel vorher entfernt wurden. Die Spendenbeutel der Transfusionszwischenfälle waren mit einem Barcode versehen, dessen Entschlüsselung nur durch den Betreuer der Dissertation möglich war.

In Zusammenschau dieser Fakten hatte die Ethikkommission keine Einwände gegen die Durchführung der Studien.

2.2.1 **Untersuchung bakterieller Transfusionszwischenfälle Mai/Juni 2016**

In Phase 1 wurden die drei Transfusionszwischenfälle des DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen aus dem Juni 2016, die alle durch bakteriell kontaminierte Pool-TKs aufgrund der Keime *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus dysgalactiae Subtyp equisimilis* und *Klebsiella pneumoniae* verursacht wurden, untersucht. Zwei der Zwischenfälle waren in der Laufzeitverlängerung detektiert worden. Zunächst wurden Wachstumskurven der drei Keime erstellt, um im zweiten Schritt Rückschlüsse auf mögliche Kontaminationszeitpunkte ziehen zu können.

2.2.1.1 Untersuchte Bakterien

Staphylococcus epidermidis ist ein gram-positives, Koagulase negatives Bakterium. Weiterhin ist es fakultativ pathogen und auf der menschlichen Haut und Schleimhaut anzutreffen.⁷⁷ Es ist außerdem ein häufiger Erreger fremdkörperassoziierter Infektionen und einer der häufigsten Sepsiserreger bei immungeschwächten Patienten sowie Früh- und Neugeborenen.⁷⁸

Bei *Streptococcus dysgalactiae* handelt es sich um ein stabförmiges, gram-positives Bakterium, welches sich kettenförmig anordnet. Die Gruppe der *Streptococcus dysgalactiae* kann weiter unterteilt werden in verschiedene Subtypen und damit den Serogruppen C oder L angehören. Der Keim kann Fähigkeiten zur alpha- oder beta-Hämolyse haben oder auch gar keine Hämolyseeigenschaft besitzen. Eine Streptokinaseaktivität ist nicht vorhanden. Zu finden ist der Subtyp *dysgalactiae* vor allem bei Tieren. Nach einer finnischen Studie macht er circa 7,7% der Mastitisursachen bei Kühen aus.⁷⁹

Der Subtyp *equisimilis* wird hauptsächlich beim Menschen und bei Schweinen nachgewiesen. Bei Schweinen verursacht er Polyarthritiden und Septikämien.⁸⁰ Diese Spezies besitzt die Eigenschaft der beta-Hämolyse. Eine Streptokinaseaktivität gegenüber menschlichen Proteinen ist nachweisbar.⁸¹ Weiterhin ist eine Ähnlichkeit der Virulenzfaktoren von *Streptococcus pyogenes* nachweisbar⁸², wodurch der Keim beim Menschen auch ähnliche Symptome wie *Streptococcus pyogenes* verursachen kann, allerdings ist er weniger virulent.⁸³

Auch existieren etliche Case-Reports über Meningitis oder Endokarditis beim Menschen verursacht durch *Streptococcus dysgalactiae*.

Klebsiella pneumoniae ist ein ubiquitär vorkommendes, stabförmiges, gram-negatives, fakultativ anaerobes Bakterium aus der Gruppe der Enterobakterien, welches eine Kapsel besitzt. Ebenfalls sind, wie bei allen gram-negativen Bakterien, Endotoxine vorhanden, die pyrogen wirken und nicht selten zum septischen Schock führen können.⁸⁴

Es besitzt Fimbrien, jedoch keine Geißeln, wodurch es sich nicht eigenständig fortbewegen kann.

Zu finden ist *Klebsiella pneumoniae* hauptsächlich in der menschlichen Darmflora und den oberen Atemwegen. Pathologisch ist es vor allem als ein Verursacher von respiratorischen Infektionen inklusive Pneumonien (früher vor allem als Friedreich-Pneumonie bekannt), Wund- und Harnwegsinfektionen sowie Septikämien im Rahmen nosokomialer Infektionen. Ebenso sind Weichteilinfekte möglich.⁸⁵

Unter diesen nosokomialen Infektionen sind vor allem antibiotikaresistente Varianten, die eine Carbapenemase besitzen, gefürchtet.⁸⁶

2.2.1.2 Aufbau und Ablauf

Zu allen drei oben genannten Keimen wurde eine Wachstumskinetik erstellt, welche bei der Suche nach der möglichen Kontaminationsquelle der gehäuften Zwischenfälle helfen sollte. Hierzu wurden Bakterienlösungen mit jeweils 10 CFU/ml der zu untersuchenden Bakterien erstellt und anschließend jeweils zwei TKs damit beimpft. Im weiteren Verlauf wurde das Wachstumsverhalten über vier Tage beobachtet.

Der genaue Ablauf gestaltete sich wie folgt:

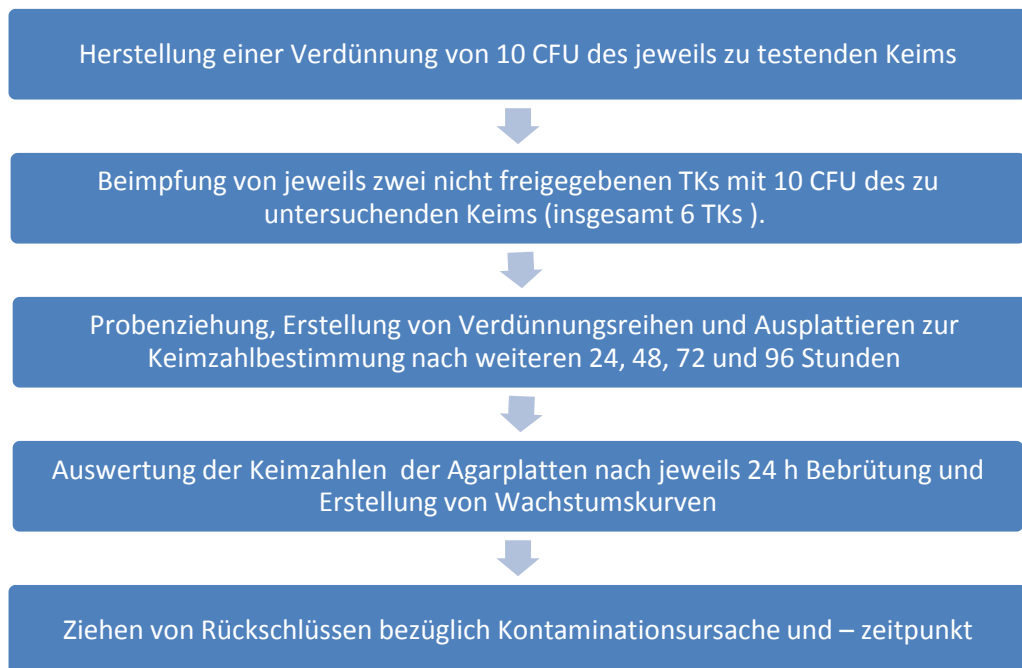


Abbildung 2: Ablauf Untersuchung Transfusionszwischenfälle

2.2.2 Bactiflow-, PCR- und BacT/ALERT-Mini-Pool-Tests

Für die Testung wurden Bakterien ausgewählt, die in der Vergangenheit zu schweren Komplikationen durch Übertragung mittels Blutkomponenten geführt haben (Tabelle 4).

2.2.2.1 Bactiflow-Methode



Abbildung 3: Bactiflow-Gerät

Bactiflow ist ein Durchflusszytometer, welches ursprünglich für die Lebensmittelindustrie entwickelt wurde.⁸⁷ Zur Studiendurchführung wurde ein Gerät der Firma Chemunex verwendet.

Mit einem speziellen Färbesubstrat (Chem Chrome V23) werden die Zellen angefärbt. Das Substrat gelangt passiv in die Zelle hinein. Im Inneren von lebenden Zellen wird es enzymatisch gespalten. Dabei entsteht Fluorchrom, welches die Zelle nun nicht mehr verlassen kann. Durch einen Laser mit einer Lichtwellenlänge von 488 nm wird das Fluorchrom zur Fluoreszenz angeregt. Es wird dann eine Wellenlänge von 515 nm emittiert und im Bactiflow gemessen.

Dieser Mechanismus funktioniert nur bei Mikroorganismen, die eine Membranintegrität und eine Enzymaktivität besitzen.

Der Vorteil des Bactiflow-Verfahrens ist der kurze Zeitaufwand von unter drei Stunden.² Die Sensitivität des Herstellers liegt bei 150 Counts.⁶⁹ Die Anzahl der Counts entspricht der Einheit CFU/ml. In der Anwendung beim DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen wird die Positivgrenze auf 300 Counts festgelegt, um damit die Spezifität der Ergebnisse zu erhöhen.

Probengewinnung durch den Automaten:

Hierzu besitzt der Bactiflow ein automatisches Modul zur Proben- und Reagenzienpipettierung und zum Injizieren der Proben in das Zytometer.

Die Proben werden nach Anleitung gemischt und in 20 ml Tubes Reagenzröhrchen gegeben. Diese werden in den vorgesehenen Halter platziert. Hinzu kommen jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Die Positivkontrolle sollte > 5000 Counts/ml erreichen.

Zu Beginn wird CS26A als Gegenfärbungsmittel durch den Automat in alle Röhrchen pipettiert. Dann werden das Färbesubstrat ChemChromV23 und die Markierungslösung ChemSol B24 hinzugegeben. Dieses Markierungsgemisch wird für eine bestimmte Zeit mit der Probe inkubiert und dann durch den Pipettierarm des Automaten durch Aufziehen und Abpipettieren der Lösung gemischt. Darauf folgt eine Injektion der Probe in die Messzelle.

Die Probe wird nun analysiert. Danach wird die Injektionsstelle gereinigt und die nächste Probe vorbereitet. Zur Reinigung wird die Nadel in der Waschstation des Automaten gespült, um Kontaminationen zu vermeiden.

Analyse:

Diese wird durch das Durchflusszytometer gestützt. Die Messzelle aus Quarz wird direkt durch die Lichtquelle beleuchtet. Der Laserstrahl ist auf den Probendurchfluss gerichtet und beleuchtet eine bestimmte Stelle der Messzelle. Die gefärbten Mikroorganismen werden in einem schmalen Flüssigkeitsfilm perlschnurartig aufgereiht und passieren so den Lichtstrahl. Die Bildung dieser Formation wird durch eine ChemSol-Hülle begünstigt. Durch den Lichtstrahl entstehen fluoreszierenden Signale, die von Photodektoren gesammelt und verarbeitet werden.

Nach der Analyse gelangen die Proben in den Abfallbehälter.

2.2.2.2 Realtime-PCR-Methode



Abbildung 4: Realtime-PCR-Gerät

Die **16s DNA PCR-Methode** wurde als 16s realtime-PCR-Methode zum Nachweis bakterieller DNA im hochkonservierten Bereich der Ribosomen in der 16s-Untereinheit angewandt.^{88, 89}

Für den Nachweis werden spezifische Oligonukleotide und eine Sonde benötigt, die mit Fluorochromen markiert ist. Der Nachweis erfolgt nach dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) Prinzip. Das Verfahren wurde bereits 1946 von Theodor Förster entwickelt. Dabei wird in einem physikalischen Prozess Energie von einem Donor-Fluorophor, der sich am 5´Ende der Sonde befindet, auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen, der sich am 3´Ende der Sonde befindet.⁹⁰

Die Taq-Polymerase fungiert dabei sowohl als eine DNA-Polymerase als auch als eine Exonuklease. Bindet die bakterienspezifische Sonde an Bakterien-DNA, wird diese während der Amplifikationsphase (60°C) von der Taq-Polymerase zerstört. Damit vergrößert sich der Abstand zwischen dem Donor-Fluorophor und dem Akzeptor-Fluorophor und der Energietransfer kann nicht mehr erfolgen. Der Donor-Fluorophor gibt damit seine Energie als Emission ab. Diese Energie kann vom PCR Cycler aufgezeichnet werden. Je mehr bakterienspezifische Sonden zerstört werden, desto stärker wird die Energie des Donor-Fluorophors aufgezeichnet. Wird eine Signalstärke über einen Grenzwert (Threshold) detektiert so ist der PCR Nachweis positiv. Zum Ausschluss einer falsch negativen Reaktion wird bei jeder Reaktion eine interne Kontrolle mit amplifiziert. Dabei werden in der Regel identische Primer jedoch mit einer unterschiedlichen Sonde verwendet. Die interne Kontrolle hat die Aufgabe bei negativen Untersuchungsproben eine Inhibition innerhalb der PCR Reaktion auszuschließen.⁹¹

2.2.2.3 BacT/ALERT Methode



Abbildung 5: BacT/ALERT Kulturmedien

BacT/ALERT ist ein colorimetrisches Detektionssystem mittels Kulturmedium der Firma Biomérieux. Die Messung erfolgt über einen Flüssigemulsionsensor, welcher „einen sichtbaren Farbumschlag [zeigt], wenn sich der pH-Wert durch die bei Wachstum von Mikroorganismen zunehmende CO₂-Konzentration ändert“. Alle zehn Minuten misst und analysiert das System diesen Farbumschlag und ermittelt über einen Schwellenwert vorhandene Mikroorganismen.

Das Ergebnis ist qualitativ negativ oder positiv. Für die Durchführung des Verfahrens werden Proben sowohl in spezielle aerobe als auch anaerobe Blutkulturflaschen gefüllt, die im Anschluss in einen speziellen Brutschrank gegeben werden. Dieser zeigt positive Proben an und ermittelt eine zugehörige Wachstumskurve.

2.2.2.4 Aufbau und Ablauf

Zunächst mussten beim PEI Langen die Bakterienstämme für die Durchführung der Studie beantragt werden. Die daraufhin für die Beimpfung bereitgestellten Bakterien sind unter „Material“ im Kapitel 2.1.4 genannt.

Dann mussten zu Beginn entsprechende Bakterienverdünnungen von 10 CFU/ml hergestellt werden, um Pool-TKs und Apherese-TKs hiermit zu beimpfen. Im ersten Schritt wurden diese in Einzelmessungen getestet. Im zweiten Schritt wurde die Sensitivität für Mini-Pools aus jeweils fünf und zehn Pool-TK sowie aus jeweils fünf und zehn Apherese-TK evaluiert. Diese wurde sowohl für die Bactiflow- als auch für die PCR-Methode getestet. Als Goldstandard und Vergleichswert für das bakterielle Wachstum diente die BacT/ALERT-Methode, die hiermit ebenfalls für 10er-Pooltests für Pool- und Apherese-TKs validiert werden sollte. Hierbei sollte außerdem am Beispiel der Pool-TKs eine Evaluation erfolgen, ab welchem Zeitpunkt mit einem Positivergebnis für Problemkeime gerechnet werden kann, um eine eventuelle Aufnahme von BacT/ALERT in die Routine überdenken zu können.

Von jedem Bakterium wurden nach entsprechender Verdünnung dann jeweils 10 CFU in die zu testenden Spendenbeutel gespikt. Die Anzahl der Replikate wurde für Pool-TKs jeweils auf fünf und Apherese-TKs jeweils auf zwei festgesetzt. Die Auswertung des Positivzeitpunktes für BacT/ALERT erfolgte nur für Pool-TKs.

Tag 0

- Herstellung von Verdünnungsreihen der einzelnen Bakterien (Tabelle 4) mittels NaCl bis zum Erhalt von jeweils 10 CFU/ml.
- Kontrolle: Beimpfung von jeweils 2 Agarplatten á 0,5 ml der 10 CFU/ml-Verdünnung und Bebrütung bei 37 °C für 24 h .
- Beimpfung von je 5 Pool- und 2 Apherese-TKs mit jeweils 10 CFU/ml des zu testenden Bakteriums unter Lamina Flow Vorher: Abziehung von jeweils 0,5 ml je TK und Ausplattieren sowie jeweils 5 ml zur Bebrütung von aeroben und anaeroben BacT/ALERT-Flaschen zwecks Negativkontrolle.
- Inkubation der beimpften TKs auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für 48 h.

Tag 2

- Auswertung aller an Tag 0 beimpften Agarplatten.
- Entnahme von 12 ml/ TK .
- Ausplattieren von 0,5 ml pur und 0,5 ml einer 1:100 -Verdünnung als Kontrolle, Inkubation bei 37° C.
- Vorbereitung von jeweils 3 Proben/TK: pur, 1:5-Verdünnung (5er-Pool), 1:10-Verdünnung (10er-Pool).
- Jeweils Beimpfung einer aeroben und anaeroben BacT/ALERT Blutkulturflasche.
- Vorbereitung aller Proben nach Mischanleitung des Bactiflow.
- Testung aller Proben per Bactiflow und PCR jeweils mit Positiv- und Negativkontrolle.

Tag 3

- Jeweils Wiederholung des Verfahrens von Tag 2.
- Auswertung der BacT/ALERT Tests für 10er-Pools.

Tag 4

- Erneute Wiederholung des Verfahrens von Tag 2 und 3.
- Auswertung der BacT/ALERT Tests für 10er-Pools.

Abbildung 6: Ablauf Bactiflow-, BacT/ALERT- und PCR- Mini-Pool-Tests

Für alle positiven Messungen erfolgte nach jeder Messreihe eine qualitative Keimdifferenzierung durch das Institut für Mikrobiologie des Universitätsklinikums Frankfurt. Bei abweichenden Ergebnissen muss von Sekundärkontamination ausgegangen werden.

Generell erfolgte die Entnahme aus dem Brutschrank, sobald ein positives Ergebnis angezeigt wurde, spätestens jedoch nach sieben Tagen. Anschließend wurden die Positivzeitpunkte mittels der vom Brutschrank angegebenen Wachstumskurven bei allen Pool-TK-Proben ausgewertet.

Im Falle eines negativen Bactiflow-Tests diente die BacT/ALERT-Messung gleichzeitig als Referenzmethode zur Beantwortung der Frage des korrekt negativen oder falsch negativen Ergebnisses.

2.2.3 Transportvalidierung

Für die Testung wurden in Anlegung an 2.2.2 exemplarisch folgende Bakterien verwendet: *S. epidermidis*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*

2.2.3.1 Beschreibung der Methoden

Für die Bakterientestung von Pool-TKs sind drei Standorte geplant: Frankfurt, Plauen und Ulm. Um sicherzustellen, dass die Testsensitivität nicht durch den vorherigen Transport leidet, wurden die Transportbedingungen wie folgt imitiert und die Bakterientestung per Bactiflow-Pooltests, PCR-Pooltests sowie BacT/ALERT-Pooltests danach erneut durchgeführt:

Es wurde davon ausgegangen, dass eine maximale Transportzeit von sechs Stunden von den deutschlandweiten DRK-Blutspendedienst-Standorten zu einem der drei Testinstitute in Frankfurt, Plauen sowie Ulm nicht überschritten wird und eine Bakterientestung innerhalb von 24 h durchgeführt werden kann.

2.2.3.2 Aufbau und Ablauf

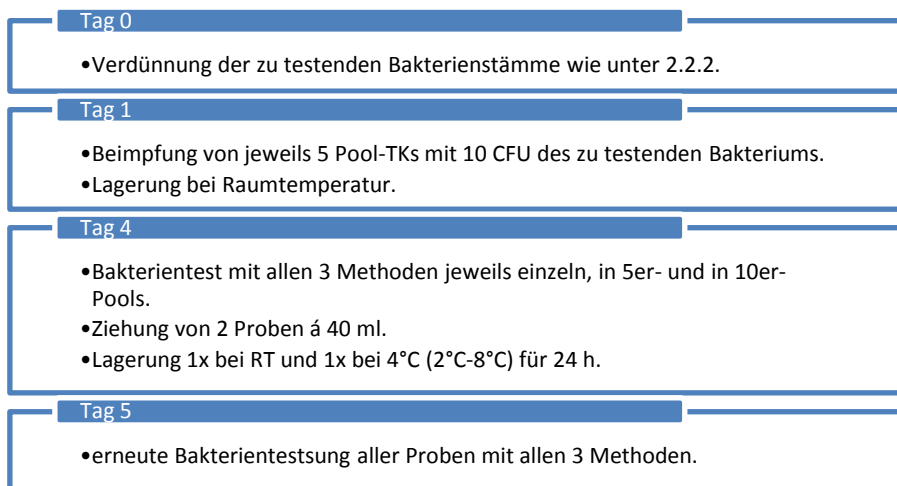
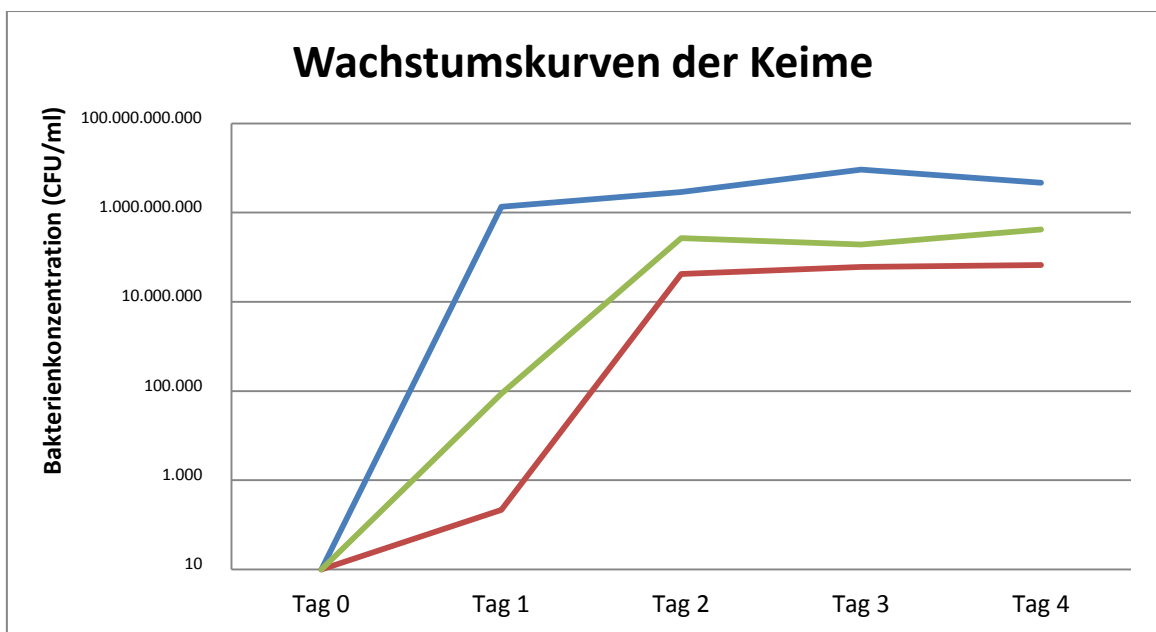


Abbildung 7: Ablauf Transportvalidierung

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung Transfusionszwischenfälle:

Die folgende Abbildung (Abbildung 8) gibt einen Überblick über die einzelnen untersuchten Wachstumskinetiken, auf die im Nachgang noch einzeln eingegangen wird:



— <i>K. pneumoniae</i>	10	1355x10 ⁶	2910x10 ⁶	9260x10 ⁶	4635x10 ⁶
— <i>S. dysgalacticae</i>	10	8750	2675x10 ⁵	1920x10 ⁵	4155x10 ⁵
— <i>S. epidermidis</i>	10	215	4235x10 ⁴	6015x10 ⁴	6700x10 ⁴

Abbildung 8: Übersicht Wachstumskinetiken

3.1.1 Zwischenfall 1: *Staphylococcus epidermidis*

Das Pool-TK kam vom Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen Institut Kassel. Am vierten Tag nach der Spende wurde eine Probenziehung für die Laufzeitverlängerung an Tag 5 durchgeführt. Transfundiert wurde das TK jedoch bereits an Tag 4 am Klinikum Kassel. Das Blutprodukt wurde ausgegeben, bevor das Ergebnis der Probenziehung vorlag. Dies erfolgte in Übereinstimmung mit dem Votum 38 AK Blut von 2008.

Bei der Probenziehung für die Laufzeitverlängerung ergab sich eine bakterielle Kontamination mit 40.000 Counts/ml. Ein EK der gleichen Spendergruppe war noch vorhanden und wurde gesperrt, drei weitere angefordert. Der Empfänger des bereits transfundierten TKs verstarb im Verlauf Krankheitsverlauf seiner Grunderkrankung. Ein todesursächlicher Zusammenhang zu der bakteriellen Kontamination des transfundierten TKs wurde aufgrund der schweren Vorerkrankungen des Patienten für unwahrscheinlich erachtet.

Wachstumsauswertung:

Die nachgewiesene Kontaminationszahl von 40.000 CFU/ml wurde beim Versuch nach circa anderthalb Tagen erreicht. Eine Kontamination an Tag 1 oder 2 ist also möglich, wenn circa 10 CFU/ml Anfangskontamination vorhanden waren. Eine eventuell frühere Kontamination mit niedriger Anfangskonzentration, während der Spende, ist ebenfalls denkbar.

In diesem Fall ist die frühere Kontamination des TKs direkt zum Zeitpunkt der Spende am wahrscheinlichsten, da es sich um einen Keim der normalen Hautflora handelte und es durchaus möglich ist, dass beispielsweise eine einzelne CFU trotz predonation sampling in die Spende gelangte.

Es kam keinesfalls zu einem Verstoß gegen die Regularien zur Thrombozytentransfusion, da eine Transfusion bis einschließlich Tag 4 auch ohne vorherige Testung auf Bakterien zugelassen ist.

3.1.2 Zwischenfall 2: *Streptococcus dysgalacticae*

Das Pool-TK kam aus dem DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen Institut Mannheim. Ein Tag nach der Transfusion wurden bei dem betroffenen Patienten klinische Symptome einer Sepsis beobachtet und antibiotisch behandelt. Der klinische Zustand des Patienten konnte stabilisiert werden. Ein ursächlicher Zusammenhang von Symptomen und Bakteriennachweis im TK galt als wahrscheinlich.

Wachstumsauswertung:

Eine Kontaminationszahl ist leider nicht bekannt. Daher ist die Rückrechnung anhand der Wachstumskurve nicht möglich. Da es sich um einen Hautkeim handelte, der durch Kontakt zu Tieren, besonders Schweinen, übertragen werden kann, ist, aufgrund der strengen Hygienevorgaben im Labor, eine Kontamination durch den Spender wahrscheinlich. Die Wachstumskurve zeigte einen steilen Anstieg bis Tag 2 und dann nahezu ein Wachstumsplateau. Ab diesem Tag war außerdem eine starke Verunreinigung des TK-Beutels sichtbar. Ein offensichtlich verunreinigtes TK würde mit einer annähernd 100-prozentigen Wahrscheinlichkeit nicht zur Transfusion freigegeben, da es die Sichtkontrolle nicht bestehen würde. Die Konzentration im TK muss also wesentlich geringer gewesen sein. Dies ist ebenfalls ein Indiz für die frühe Kontamination bei der Spende.

Der Spenderfragebogen enthält keine Angaben zu Beruf oder zum möglichen Kontakt zu Tieren. Da der Schutz der Spenderdaten in diesem Fall höher gewichtet wurde als dieses eine verunreinigte TK, war es der Verfasserin nicht möglich, die Spende zurück zu verfolgen und die fünf Spender des Pool-TK dahingehend zu befragen.

3.1.3 Zwischenfall 3: *Klebsiella pneumoniae*

Bei diesem Keim kam es zu keiner bakteriellen Übertragung mittels eines Blutproduktes. Die Kontamination des Pool-TKs wurde durch Bactiflow-Testung zur Laufzeitverlängerung beim DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Zelltherapie Heidelberg detektiert. Dies erfolgte in Übereinstimmung mit dem Votum 38 AK Blut von 2008. Es wurde eine Kontamination $>2 \times 10^7$ Count/ml gemessen. Das Pool-TK wurde daraufhin nicht transfundiert. Alle vier EKs wurden gesperrt und mittels BacT/ALERT untersucht. Das Ergebnis war allerdings negativ.

Wachstumsauswertung:

Klebsiella pneumoniae hatte das sprunghafteste Wachstum der drei getesteten Bakterienarten. Ein Wachstumsplateau war bereits zwischen Tag 1 und 2 erreicht. Die durch Bactiflow detektierte Kontamination war möglicherweise aufgrund des sehr schnellen Wachstums schon an Tag 2 nach der Spende erreicht. Man kann in diesem Fall eindeutig von einem Erfolg der Bactiflow-Testung sprechen, da eine möglicherweise schwer verlaufende Infektion verhindert werden konnte.

3.1.4 Gesamtergebnis Untersuchung Transfusionszwischenfälle

Interne Audits ergaben keinerlei Auffälligkeiten oder Hinweise auf mögliche Fehler.

Weiterhin hat es zukünftig keine weitere Häufung von Kontaminationen

beziehungsweise Transfusionszwischenfällen gegeben.

Eine Zurückverfolgung der Transfusionsindikation und somit Rückschlüsse auf eventuelle empfängerbedingte Risikofaktoren war nicht mehr möglich.

3.2 Ergebnisse Bactiflow-, PCR und BacT/ALERT Mini-Pool-Tests

Alle an Tag 0 angefertigten Negativkontrollen, die per Agarplatten und per BacT/ALERT ausgewertet wurden, waren negativ. Alle für die Studie verwendeten TKs waren somit vor dem Spiken steril.

Die folgenden Tabellen geben die genauen Messergebnisse geordnet nach der Art der Bakterien wieder:

3.2.1 Pool-TK-Messungen

Staphylococcus aureus

Spikekonzentration 12 CFU/Beutel

Einzelprobenmessungen:

Tabelle 12: Ergebnisse Bactiflow *S. aureus* Einzelmessungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2610260	13611709	20186553
2	1043149	13722665	13409477
3	20126	14065483	20376768
4	5744	152551183	21256866
5	1334680	17144612	22509725
Statistische Angaben			
Mittel	1002792	42219130	19547878
SD	1078827	61694721	3552045
2 SD	2157654	123389441	7104091
Min	5744	13611709	13409477
Max	2610260	152551183	22509725

Tabelle 13: Ergebnisse PCR *S. aureus* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	21,98	18,74	17,06
2	24,77	18,21	17,95
3	21,59	17,46	14,23
4	21,23	16,24	13,51
5	21,55	18,43	18,06
Statistische Angaben			
Mittel	22,22	17,82	16,16
SD	1,45	1,00	2,14
2 SD	2,90	2,00	4,29
Min	21,23	16,24	13,51
Max	24,77	18,74	18,06

Tabelle 14:Ergebnisse BacT/ALERT *S. aureus* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2,5	2,9	5,1
2	2,1	3,1	3,2
3	2,6	3,5	2,3
4	2,3	3,2	4,1
5	2,1	4,1	2,6
Statistische Angaben			
Mittel	2,3	3,4	3,5
SD	0,2	0,5	1,1
2 SD	0,5	0,9	2,3
Min	2,1	2,9	2,3
Max	2,6	4,1	5,1

5er-Pools:

Tabelle 15:Ergebnisse Bactiflow *S. aureus* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	782450	6940695	14890417
2	263081	5492420	5260284
3	46278	4043244	13910928
4	2722042	6418569	15057650
5	2732719	8766032	15973472
Statistische Angaben			
Mittel	1309314	6332192	13018550
SD	1321867	1749701	4398307
2 SD	2643734	3499402	8796613
Min	46278	4043244	5260284
Max	2732719	8766032	15973472

Tabelle 16: Ergebnisse PCR *S. aureus* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22,42	19,27	17,39
2	25,56	18,5	18,54
3	22,04	17,8	14,75
4	21,41	15,1	13,74
5	22,62	19,57	18,27
Statistische Angaben			
Mittel	22,81	18,05	16,54
SD	1,60	1,79	2,17
2 SD	3,21	3,57	4,33
Min	21,41	15,1	13,74
Max	25,56	19,57	18,54

Tabelle 17: Ergebnisse BacT/ALERT *S. aureus* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2,8	3,2	4,8
2	2,7	3,5	3,9
3	3,4	3,1	3,4
4	3,1	3,6	4,3
5	2,9	3,7	3,2
Statistische Angaben			
Mittel	3,0	3,4	3,9
SD	0,3	0,3	0,7
2 SD	0,6	0,5	1,3
Min	2,7	3,1	3,2
Max	3,4	3,7	4,8

10er-Pools:

Tabelle 18: Ergebnisse Bactiflow *S. aureus* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	416029	3633236	12128391
2	153390	3940424	2839883
3	17786	2144857	10409351
4	1636412	4614435	12654075
5	879264	593722	13668892
Statistische Angaben			
Mittel	620576	2985335	10340118
SD	656182	1613393	4355783
2 SD	1312364	3226787	8711565
Min	17786	593722	2839883
Max	1636412	4614435	13668892

Tabelle 19: Ergebnisse PCR *S. aureus* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	23,38	18,56	18,57
2	26,04	19,4	18,15
3	21,84	19,37	15,62
4	21,14	18,04	14,09
5	22,66	15,36	18,38
Statistische Angaben			
Mittel	23,01	18,15	16,96
SD	1,89	1,66	2,00
2 SD	3,78	3,32	4,01
Min	21,14	15,36	14,09
Max	26,04	19,40	18,57

Tabelle 20: Ergebnisse BacT/ALERT *S. aureus* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,1	3,4	4,6
2	3,2	3,8	3,8
3	2,9	4,1	3,1
4	3,4	3,6	4,6
5	2,8	3,9	3,7
Statistische Angaben			
Mittel	3,1	3,8	4,0
SD	0,2	0,3	0,6
2 SD	0,5	0,5	1,3
Min	2,8	3,4	3,1
Max	3,4	4,1	4,6

Staphylococcus epidermidis

Spikekonzentration: 10 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 21: Ergebnisse Bactiflow *S. epidermidis* Einzelmessungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	21389908	21661943	21120067
2	21236187	21641560	21776441
3	20531337	21955214	22011741
4	18772517	21606173	21989794
5	19597765	2254884	22474955
Statistische Angaben			
Mittel	20305543	17823955	21874600
SD	1111761	8704492	492813
2 SD	2223521	17408983	985626
Min	18772517	2254884	21120067
Max	21389908	21955214	22474955

Tabelle 22: Ergebnisse PCR *S. epidermidis* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	27,45	26,45	16,43
2	26,89	25,67	17,45
3	27,51	25,74	18,25
4	27,98	25,98	18,35
5	28,05	24,97	29,46
Statistische Angaben			
Mittel	27,58	25,76	19,99
SD	0,47	0,54	5,35
2 SD	0,94	1,08	10,70
Min	27,45	24,97	16,43
Max	28,05	26,45	29,46

Tabelle 23: Ergebnisse BacT/ALERT *S. epidermidis* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	4,08	6,72	6,21
2	4,08	6,48	5,78
3	4,08	6,48	6,11
4	4,08	6,72	5,92
5	4,08	6,48	5,32
Statistische Angaben			
Mittel	4,1	6,6	5,9
SD	0,0	0,1	0,3
2 SD	0,0	0,3	0,7
Min	4,1	6,5	5,3
Max	4,1	6,7	6,2

5er-Pools:

Tabelle 24: Ergebnisse Bactiflow *S. epidermidis* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	11449750	12469777	8664305
2	11726554	15160881	14852705
3	10498792	13985855	12256013
4	8922454	11032301	6067254
5	11952425	11626511	9938930
Statistische Angaben			
Mittel	10909995	12855065	10355841
SD	1241387	1701157	3363760
2 SD	2482775	3402313	6727520
Min	8922454	11032301	6067254
Max	11952425	15160881	14852705

Tabelle 25: Ergebnisse PCR *S. epidermidis* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	28,51	27,56	17,33
2	28,15	25,13	18,87
3	27,49	24,97	19,24
4	26,89	25,22	19,77
5	28,01	26,94	20,5
Statistische Angaben			
Mittel	27,81	25,96	19,14
SD	0,63	1,20	1,18
2 SD	1,26	2,40	2,37
Min	26,89	24,97	17,33
Max	28,51	27,56	20,50

Tabelle 26: Ergebnisse BacT/ALERT *S. epidermidis* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	5,04	6,12	6,21
2	5,28	6,24	6,45
3	5,28	6,08	6,22
4	5,52	6,31	6,52
5	5,76	6,44	6,11
Statistische Angaben			
Mittel	5,4	6,2	6,3
SD	0,3	0,1	0,2
2 SD	0,5	0,3	0,3
Min	5,0	6,1	6,1
Max	5,8	6,4	6,5

10er-Pools:

Tabelle 27: Ergebnisse Bactiflow *S. epidermidis* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2159222	4497662	3416207
2	3971729	7217676	5633
3	4175607	6679707	4388688
4	3495070	3543152	2253556
5	6602029	3736471	3201484
Statistische Angaben			
Mittel	4080731	5134934	2653114
SD	1613461	1704386	1663133
2 SD	3226921	3408771	3326265
Min	2159222	3543152	5633
Max	6602029	7217676	4388688

Tabelle 28: Ergebnisse PCR *S. epidermidis* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	28,67	28,1	18,39
2	29,41	26,19	20,05
3	29,23	26,08	20,16
4	28,26	26,00	21,16
5	29,10	27,82	21,77
Statistische Angaben			
Mittel	28,93	26,84	20,31
SD	0,47	1,03	1,29
2 SD	0,93	2,06	2,57
Min	28,26	26,00	18,39
Max	29,41	28,10	21,77

Tabelle 29: Ergebnisse BacT/ALERT *S. epidermidis* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	6,24	6,72	7,68
2	5,76	6,48	6,72
3	6,24	6,48	6,48
4	6,24	6,72	6,72
5	6,00	6,48	6,72
Statistische Angaben			
Mittel	6,1	6,6	6,9
SD	0,2	0,1	0,5
2 SD	0,4	0,3	0,9
Min	5,8	6,5	6,5
Max	6,2	6,7	7,7

Streptococcus pyogenes

Spikekonzentration 16 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 30: Ergebnisse Bactiflow *S. pyogenes* Einzelmessungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	5103581	18651488	14833886
2	15141373	17973379	16934475
3	17209510	19328338	17623540
4	17823950	17190614	16082344
5	19620666	18190251	14233914
Statistische Angaben			
Mittel	14979816	18266814	15941632
SD	5748135	794509	1412246
2 SD	11496271	1589018	2824492
Min	5103581	17190614	14233914
Max	19620666	19328338	17623540

Tabelle 31: Ergebnisse PCR *S. pyogenes* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	21,21	22,77	22,81
2	21,56	22,45	23,15
3	22,56	24,77	22,84
4	21,89	25,46	23,84
5	20,46	20,12	21,46
Statistische Angaben			
Mittel	21,54	23,11	22,82
SD	0,78	2,11	0,87
2 SD	1,56	4,22	1,73
Min	20,46	20,12	21,46
Max	22,56	25,46	23,84

Tabelle 32: Ergebnisse BacT/ALERT *S. pyogenes* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	7,92	3,58	3,11
2	3,12	3,49	3,27
3	2,40	2,86	2,73
4	2,40	2,67	2,59
5	2,40	2,83	2,24
Statistische Angaben			
Mittel	3,6	3,1	2,8
SD	2,4	0,4	0,4
2 SD	4,8	0,8	0,8
Min	2,4	2,5	2,2
Max	7,9	3,6	3,3

5er-Pools:

Tabelle 33: Ergebnisse Bactiflow *S. pyogenes* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	876998	800487	157328
2	925037	3596045	1134184
3	786093	6712595	511563
4	3232584	4910254	514251
5	4536631	1005600	81211
Statistische Angaben			
Mittel	2071469	3404996	479707
SD	1718900	2538852	416316
2 SD	3437800	5077704	832632
Min	786093	800487	81211
Max	4536631	6712595	1134184

Tabelle 34: Ergebnisse PCR *S. pyogenes* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	20,46	23,80	24,14
2	22,71	24,22	24,19
3	22,13	25,16	23,01
4	22,98	26,50	24,01
5	19,97	23,32	22,49
Statistische Angaben			
Mittel	21,65	24,60	23,57
SD	1,36	1,26	0,77
2 SD	2,71	2,52	1,54
Min	19,97	23,32	22,49
Max	22,98	26,50	24,19

Tabelle 35: Ergebnisse BacT/ALERT *S. pyogenes* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	9,12	8,53	8,16
2	7,68	7,27	6,67
3	6,96	7,34	6,53
4	6,48	6,81	6,67
5	6,96	6,54	6,42
Statistische Angaben			
Mittel	7,4	7,3	6,9
SD	1,0	0,8	0,7
2 SD	2,1	1,5	1,4
Min	6,5	6,5	6,4
Max	9,1	8,5	8,2

10er-Pools:

Tabelle 36: Ergebnisse Bactiflow *S. pyogenes* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	818989	98003	4477
2	1225437	662322	47019
3	1480838	273390	34234
4	1570189	332152	23215
5	1089941	111852	11287
Statistische Angaben			
Mittel	1237079	295544	24046
SD	302888	228649	17161
2 SD	605776	457299	34322
Min	818989	98003	4477
Max	1570189	662322	47019

Tabelle 37: Ergebnisse PCR *S. pyogenes* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	23,35	25,27	24,96
2	21,92	25,09	23,87
3	24,02	24,87	24,30
4	21,95	25,52	24,10
5	22,21	25,10	24,67
Statistische Angaben			
Mittel	22,69	25,17	24,38
SD	0,95	0,24	0,44
2 SD	1,89	0,48	0,87
Min	21,92	24,87	23,87
Max	24,02	25,52	24,96

Tabelle 38: Ergebnisse BacT/ALERT *S. pyogenes* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	8,64	8,64	10,80
2	7,44	8,64	10,80
3	6,96	8,40	10,32
4	6,96	8,88	10,56
5	7,68	8,16	9,12
Statistische Angaben			
Mittel	7,5	8,5	10,3
SD	0,7	0,3	0,7
2 SD	1,4	0,5	1,4
Min	7,0	8,2	9,1
Max	8,6	8,9	10,8

Bacillus cereus:

Spikekonzentration 15 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 39: Ergebnisse Bactiflow *B. cereus* Einzelmessungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	12165580	13565625	17594610
2	8448095	9522773	14824590
3	6937161	8969370	12291684
4	8656530	9954794	14353405
5	5575766	7491947	11781368
Statistische Angaben			
Mittel	8356626	9900902	14169131
SD	2467514	2249828	2314288
2 SD	4935028	4499655	4628575
Min	5575766	7491947	11781368
Max	12165580	13565625	17594610

Tabelle 40: Ergebnisse PCR *B. cereus* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	17,21	16,48	15,11
2	17,23	16,12	16,08
3	17,53	15,89	15,87
4	18,46	16,03	15,16
5	19,34	18,46	17,89
Statistische Angaben			
Mittel	17,95	16,60	16,02
SD	0,93	1,06	1,13
2 SD	1,85	2,13	2,26
Min	17,21	15,89	15,11
Max	19,34	18,46	17,89

Tabelle 41: Ergebnisse BacT/ALERT *B. cereus* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,60	3,20	3,18
2	3,60	3,24	3,16
3	2,40	2,85	2,76
4	2,40	2,22	2,56
5	3,60	2,86	2,63
Statistische Angaben			
Mittel	3,1	2,9	2,9
SD	0,7	0,4	0,3
2 SD	1,3	0,8	0,6
Min	2,4	2,2	2,6
Max	3,6	3,2	3,2

5er-Pools:

Tabelle 42: Ergebnisse Bactiflow *B. cereus* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	402697	738315	4089966
2	396552	1716649	3372975
3	233279	1019735	2390720
4	146413	1749047	4319806
5	249012	586562	3017672
Statistische Angaben			
Mittel	285591	1162062	3438228
SD	111211	543860	787455
2 SD	222421	1087721	1574910
Min	146413	586562	2390720
Max	402697	1749047	4319806

Tabelle 43: Ergebnisse PCR *B. cereus* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	17,99	15,92	15,30
2	17,39	15,77	17,61
3	16,79	17,14	16,15
4	17,18	16,10	15,29
5	19,10	18,21	17,29
Statistische Angaben			
Mittel	17,69	16,63	16,33
SD	0,90	1,03	1,09
2 SD	1,80	2,07	2,18
Min	16,79	15,77	15,29
Max	19,10	18,21	17,61

Tabelle 44: Ergebnisse BacT/ALERT *B. cereus* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	4,32	4,12	3,94
2	4,08	3,96	3,82
3	4,32	4,18	4,08
4	4,08	4,21	3,86
5	4,08	3,86	3,64
Statistische Angaben			
Mittel	4,2	4,1	3,9
SD	0,1	0,2	0,2
2 SD	0,3	0,3	0,3
Min	4,1	3,7	3,6
Max	4,3	4,2	4,1

10er-Pools:

Tabelle 45: Ergebnisse Bactiflow *B. cereus* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	475	8557	306400
2	1466	17514	298102
3	2456	32839	184661
4	3961	4952	561831
5	1149	4357	330664
Statistische Angaben			
Mittel	1901	13644	336332
SD	1355	11949	138061
2 SD	2709	23898	276122
Min	475	4357	184661
Max	3961	32839	561831

Tabelle 46: Ergebnisse PCR *B. cereus* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	18,79	17,14	16,00
2	18,65	16,74	15,56
3	17,91	17,58	16,77
4	19,05	17,38	16,30
5	20,38	19,30	18,79
Statistische Angaben			
Mittel	18,96	17,63	16,68
SD	0,90	0,99	1,26
2 SD	1,80	1,97	2,51
Min	17,91	16,74	15,56
Max	20,38	19,30	18,79

Tabelle 47: Ergebnisse BacT/ALERT *B. cereus* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	4,08	3,60	4,56
2	4,56	3,60	4,56
3	4,56	3,60	4,80
4	4,32	3,84	4,32
5	4,32	3,84	4,56
Statistische Angaben			
Mittel	4,4	3,7	4,6
SD	0,2	0,1	0,2
2 SD	0,4	0,3	0,3
Min	4,1	3,6	4,3
Max	4,6	3,8	4,8

Escherichia coli:

Spikekonzentration 16 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 48: Ergebnisse Bactiflow *E. coli* Einzelmessungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22414046	22901264	21509530
2	22625673	22750183	21907492
3	22947465	22615654	23202249
4	22888077	22586250	21362559
5	10531502	22330214	22423310
Statistische Angaben			
Mittel	20281353	22636713	22081028
SD	5454516	212011	749536
2 SD	10909032	424022	1499072
Min	10531502	22330214	21362559
Max	22947465	22901264	23202249

Tabelle 49: Ergebnisse PCR *E. coli* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	20,15	20,42	19,56
2	23,51	22,54	21,45
3	21,85	22,04	19,64
4	22,46	22,57	21,47
5	23,15	22,12	22,05
Statistische Angaben			
Mittel	22,22	21,94	20,83
SD	1,32	0,88	1,15
2 SD	2,65	1,76	2,30
Min	2015	2042	1956
Max	23,51	22,57	22,05

Tabelle 50: Ergebnisse BacT/ALERT *E. coli* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,60	3,48	3,22
2	3,60	3,53	3,47
3	4,08	3,88	3,68
4	3,60	3,82	3,54
5	5,04	4,09	4,11
Statistische Angaben			
Mittel	4,0	3,8	3,6
SD	0,6	0,3	0,3
2 SD	1,3	0,5	0,7
Min	3,6	3,5	3,2
Max	5,0	4,1	4,1

5er-Pools:

Tabelle 51: Ergebnisse Bactiflow *E. coli* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	19118711	21849167	22979630
2	19492750	21586393	22515948
3	20323672	22519501	23232643
4	20549379	22279065	23036995
5	2270001	21902870	22588625
Statistische Angaben			
Mittel	16350903	22027399	22870768
SD	7893254	369885	306569
2 SD	15786509	739771	613138
Min	2270001	21586393	22515948
Max	20549379	22519501	23232643

Tabelle 52: Ergebnisse PCR *E. coli* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	21,26	22,27	23,21
2	23,23	22,75	21,85
3	22,12	23,08	21,47
4	24,27	23,18	23,61
5	22,64	22,45	22,33
Statistische Angaben			
Mittel	22,70	22,75	22,49
SD	1,14	0,39	0,90
2 SD	2,27	0,78	1,80
Min	21,26	22,27	21,47
Max	24,27	23,18	23,61

Tabelle 53: Ergebnisse BacT/ALERT *E. coli* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	4,56	4,23	4,09
2	4,32	4,11	4,05
3	5,04	4,67	4,34
4	4,32	4,08	4,14
5	6,24	5,17	4,88
Statistische Angaben			
Mittel	4,9	4,5	4,3
SD	0,8	0,5	0,3
2 SD	1,6	0,9	0,7
Min	4,3	4,1	4,1
Max	6,2	5,2	4,9

10er-Pools:

Tabelle 54: Ergebnisse Bactiflow *E. coli* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	14424230	19844058	21577148
2	15146723	19432023	21551167
3	16480257	20941183	22623067
4	16625598	20896321	22457885
5	1097813	19885148	21202282
Statistische Angaben			
Mittel	12754924	20199747	21882310
SD	6581332	680042	621535
2 SD	13162665	1360085	1243071
Min	1097813	19432023	21202282
Max	16625598	20941183	22623067

Tabelle 55: Ergebnisse PCR *E. coli* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	21,15	22,84	23,94
2	21,51	21,70	20,40
3	22,81	23,28	20,00
4	23,22	22,75	21,67
5	23,76	23,50	22,52
Statistische Angaben			
Mittel	22,49	22,81	21,71
SD	1,12	0,70	1,60
2 SD	2,24	1,39	3,20
Min	21,15	21,70	20,00
Max	23,76	23,50	23,94

Tabelle 56: Ergebnisse BacT/ALERT *E. coli* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	6,00	4,80	5,52
2	5,52	5,04	4,56
3	5,52	4,56	5,04
4	5,52	4,56	5,04
5	6,72	5,04	5,04
Statistische Angaben			
Mittel	5,9	4,8	5,0
SD	0,5	0,2	0,3
2 SD	1,1	0,5	0,7
Min	5,5	4,6	4,6
Max	6,7	5,0	5,5

Klebsiella pneumoniae:

Spikekonzentration 12 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 57: Ergebnisse Bactiflow *K. pneumoniae* Einzelmessungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22784656	23032750	22725819
2	22790480	22942910	22905548
3	22813547	22968755	22841542
4	22851011	22899725	21962652
5	22691667	22731828	21683646
Statistische Angaben			
Mittel	22786272	22915194	22423841
SD	58961	113268	560868
2 SD	117922	226536	1121735
Min	22784656	22731828	21683646
Max	22851011	23032750	22905548

Tabelle 58: Ergebnisse PCR *K. pneumoniae* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	20,13	16,42	12,88
2	19,45	15,48	12,45
3	16,51	16,99	12,95
4	17,45	16,75	12,41
5	19,26	16,88	12,53
Statistische Angaben			
Mittel	18,56	16,50	12,64
SD	1,52	0,61	0,25
2 SD	3,03	1,22	0,50
Min	17,45	15,48	12,41
Max	20,13	16,99	12,95

Tabelle 59: Ergebnisse BacT/ALERT *K. pneumoniae* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	1,92	1,68	1,62
2	1,92	1,82	1,75
3	1,92	1,88	1,81
4	1,92	1,62	1,57
5	1,92	1,85	1,89
Statistische Angaben			
Mittel	1,9	1,8	1,7
SD	0,0	0,1	0,1
2 SD	0,0	0,2	0,3
Min	1,9	1,6	1,6
Max	1,9	1,9	1,9

5er-Pools:

Tabelle 60: Ergebnisse Bactiflow *K. pneumoniae* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	19939347	21487795	22042557
2	20190939	21572549	21104306
3	20106296	21550806	21468818
4	20523810	21754631	21179596
5	20583073	21835788	21907163
Statistische Angaben			
Mittel	20268693	21640314	21540488
SD	276047	147601	421947
2 SD	552093	295202	843895
Min	19939347	21487795	21104306
Max	20583073	21835788	22042557

Tabelle 61: Ergebnisse PCR *K. pneumoniae* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	20,47	16,64	13,27
2	21,13	15,95	13,20
3	16,68	17,01	13,53
4	18,18	16,39	12,69
5	19,74	17,10	12,70
Statistische Angaben			
Mittel	19,24	16,62	13,08
SD	1,80	0,47	0,37
2 SD	3,61	0,94	0,74
Min	16,68	15,95	12,69
Max	21,13	17,10	13,53

Tabelle 62: Ergebnisse Bact/ALERT *K. pneumoniae* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,60	3,21	3,12
2	3,60	3,46	3,35
3	3,60	3,32	3,41
4	3,60	3,52	3,33
5	3,60	3,38	3,29
Statistische Angaben			
Mittel	3,6	3,4	3,3
SD	0,0	0,1	0,1
2 SD	0,0	0,2	0,2
Min	3,6	3,2	3,1
Max	3,6	3,5	3,4

10er-Pools:

Tabelle 63: Ergebnisse Bactiflow *K. pneumoniae* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	18050548	19439733	19137502
2	18530056	297294	19289645
3	18952829	19876106	18997923
4	19113047	20702251	18576428
5	19231022	20396261	19419764
Statistische Angaben			
Mittel	18775500	16142329	19084252
SD	484428	8870850	325165
2 SD	968856	17741700	650329
Min	18050548	297294	18576428
Max	19231022	20702251	19419764

Tabelle 64: Ergebnisse PCR *K. pneumoniae* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	20,39	17,30	12,93
2	18,93	16,19	12,75
3	17,21	17,18	13,18
4	16,55	17,61	12,85
5	20,14	16,65	13,17
Statistische Angaben			
Mittel	18,64	16,99	12,98
SD	1,72	0,56	0,19
2 SD	3,44	1,13	0,39
Min	16,55	16,19	12,75
Max	20,39	17,61	13,18

Tabelle 65: Ergebnisse BacT/ALERT *K. pneumoniae* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,60	3,60	3,84
2	3,60	3,60	3,84
3	3,60	3,60	3,84
4	3,60	3,60	3,84
5	3,60	3,60	3,84
Statistische Angaben			
Mittel	3,6	3,6	3,8
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,0	0,0	0,0
Min	3,6	3,6	3,8
Max	3,6	3,6	3,8

Serratia marcescens:

Spikekonzentration 18 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 66: Ergebnisse Bactiflow *S. marcescens* Einzelmessungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22926849	21887129	12472230
2	20322143	19679466	12253555
3	22697303	20441031	11829185
4	22522163	21110244	13835527
5	22782594	21719394	13235323
Statistische Angaben			
Mittel	22250210	20967453	12725164
SD	1087723	917556	803483
2 SD	2175446	1835113	1606965
Min	20322143	19679466	11829185
Max	22926849	21887129	13835527

Tabelle 67: Ergebnisse PCR *S. marcescens* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	16,02	14,03	13,98
2	16,59	14,26	15,06
3	16,99	14,54	14,21
4	17,26	14,79	14,26
5	15,98	15,03	14,85
Statistische Angaben			
Mittel	16,57	14,53	14,47
SD	0,57	0,40	0,46
2 SD	1,14	0,80	0,92
Min	15,98	14,03	13,98
Max	17,26	15,03	15,06

Tabelle 68: Ergebnisse BacT/ALERT *S. marcescens* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,60	2,24	1,68
2	2,40	2,03	1,68
3	1,92	1,68	1,72
4	1,92	1,72	1,84
5	3,60	1,88	1,63
Statistische Angaben			
Mittel	2,7	1,9	1,7
SD	0,9	0,2	0,1
2 SD	1,7	0,5	0,2
Min	1,9	1,7	1,6
Max	3,6	2,2	1,8

5er-Pools:

Tabelle 69: Ergebnisse Bactiflow *S. marcescens* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	20737358	18553981	16566648
2	20440666	15897533	15316958
3	19991890	15945734	15975389
4	19971901	17239533	17242033
5	19908076	20179441	17015357
Statistische Angaben			
Mittel	20209978	17563244	16423277
SD	362882	1824950	785178
2 SD	725765	3649900	1570357
Min	19908076	15897533	15316958
Max	20737358	20179441	17242033

Tabelle 70: Ergebnisse PCR *S. marcescens* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	16,33	13,41	14,77
2	17,33	14,78	16,13
3	17,29	14,72	16,60
4	16,68	15,23	16,03
5	16,33	15,53	16,57
Statistische Angaben			
Mittel	16,79	14,73	16,02
SD	0,49	0,81	0,74
2 SD	0,99	1,62	1,49
Min	16,33	13,41	14,77
Max	17,33	15,53	16,60

Tabelle 71: Ergebnisse BacT/ALERT *S. marcescens* 5er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,60	3,42	3,35
2	3,60	3,36	3,32
3	3,60	3,32	3,21
4	3,60	3,24	3,36
5	3,60	3,48	3,28
Statistische Angaben			
Mittel	3,6	3,4	3,3
SD	0,0	0,1	0,1
2 SD	0,0	0,2	0,1
Min	3,6	3,2	3,2
Max	3,6	3,5	3,4

10er-Pools:

Tabelle 72: Ergebnisse Bactiflow *S. marcescens* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	19408959	15091202	20921351
2	18938725	12622236	20720825
3	17940323	13476773	20630751
4	18914360	15548695	21341140
5	17633321	17632951	21020372
Statistische Angaben			
Mittel	18567138	14874371	20926888
SD	747030	1945307	278628
2 SD	1494060	3890615	557256
Min	17633321	12622236	20630751
Max	19408959	17632951	21341140

Tabelle 73: Ergebnisse PCR *S. marcescens* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	18,31	15,70	16,71
2	16,96	15,67	16,62
3	16,94	15,07	17,08
4	16,32	15,61	17,08
5	17,69	16,42	17,06
Statistische Angaben			
Mittel	17,24	15,69	16,91
SD	0,77	0,48	0,23
2 SD	1,54	0,96	0,45
Min	16,32	15,07	16,62
Max	18,31	16,42	17,08

Tabelle 74: Ergebnisse BacT/ALERT *S. marcescens* 10er-Pool-Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,60	4,32	4,56
2	3,84	4,56	4,08
3	3,84	4,80	4,80
4	3,60	4,56	4,08
5	3,60	4,32	4,08
Statistische Angaben			
Mittel	3,7	4,5	4,3
SD	0,1	0,2	0,3
2 SD	0,3	0,4	0,7
Min	3,6	4,3	4,1
Max	3,8	4,8	4,8

Gesamtauswertung Pool-TKs:

Alle sieben transfusionsmedizinisch relevanten Bakterienkeime wurden von der Bactiflow-, der PCR- und auch von der BacT/ALERT-Methode (bei einer Inkubationszeit von 12 Stunden) korrekt analysiert. Die Abbildungen 9 und 10 stellen im synoptischen Vergleich die qualitative Auswertung der untersuchten Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von der Poolgröße und von den Untersuchungstagen dar. Die Analyse der Rohdaten zeigt in allen Methoden, dass eine Einzelprobenbestimmung, eine Bestimmung in 5er-Mini-Pools aber auch in 10er-Mini-Pools grundsätzlich möglich ist. Obgleich alle Proben auch in 10er-Mini-Pools ein positives Ergebnis erzielten, wird anhand einer reduzierten Count-Anzahl in der Bactiflow-Methode, höherer CT-Werte in der PCR-Methode und auch einer längeren Bebrütungszeit in der BacT/ALERT-Methode deutlich, dass die analytische Sensitivität durch die Verdünnung in Minipools gegenüber einer individuellen Bestimmung reduziert wird.

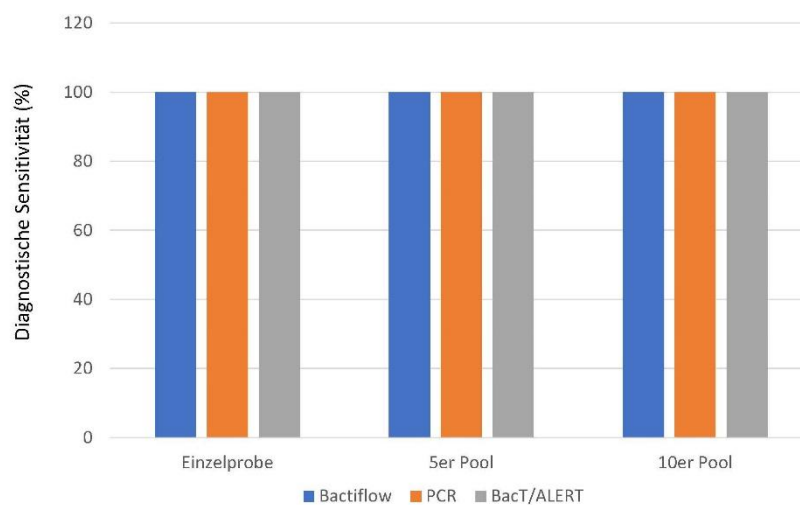


Abbildung 9: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von der Poolgröße bei Pool-TKs

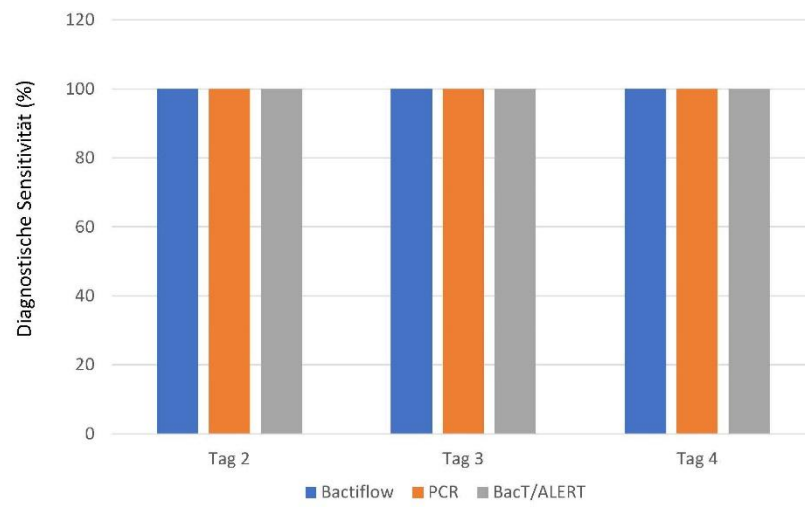


Abbildung 10: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von dem Untersuchungstag bei Pool-TKs

3.2.2 Apherese-Messungen

Staphylococcus aureus

Spikekonzentration 13 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 75: Ergebnisse Bactiflow *S. aureus* Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2812	12731824	19391967
2	832	717962	13295564
Statistische Angaben			
Mittel	1822	6724893	16343766
SD	1400	8495083	4310808
2 SD	2800	16990167	8621616
Min	832	717962	13295564
Max	2812	16990167	19391967

Tabelle 76: Ergebnisse PCR *S. aureus* Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22,21	17,46	16,54
2	22,62	19,25	16,35
Statistische Angaben			
Mittel	22,42	18,36	16,45
SD	0,29	1,27	0,13
2 SD	0,58	2,53	0,27
Min	22,21	17,46	16,35
Max	22,62	19,25	16,54

Tabelle 77: Ergebnisse Bact/ALERT *S. aureus* Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2,48	2,32	2,12
2	1,89	2,12	2,24
Statistische Angaben			
Mittel	2,2	2,2	2,2
SD	0,4	0,1	0,1
2 SD	0,8	0,3	0,2
Min	1,9	2,1	2,1
Max	2,5	2,3	2,2

5er-Pools:

Tabelle 78: Ergebnisse Bactiflow *S. aureus* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	50776	9316397	13197774
2	17427	1314733	8051069
Statistische Angaben			
Mittel	34102	5315565	10624422
SD	23581	5658031	3639270
2 SD	47163	11316062	7278540
Min	17427	1314733	8051069
Max	50776	11316062	13197774

Tabelle 79: Ergebnisse PCR *S. aureus* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	23,06	18,06	15,46
2	23,76	18,81	17,64
Statistische Angaben			
Mittel	23,41	18,44	16,55
SD	0,49	0,53	1,54
2 SD	0,99	1,06	3,08
Min	23,06	18,06	15,46
Max	23,76	18,81	17,64

Tabelle 80: Ergebnisse BacT/ALERT *S. aureus* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2,89	3,08	2,78
2	3,06	3,12	2,84
Statistische Angaben			
Mittel	3,0	3,1	2,8
SD	0,1	0,0	0,0
2 SD	0,2	0,1	0,1
Min	2,9	3,1	2,8
Max	3,1	3,1	2,8

10er-Pools:**Tabelle 81: Ergebnisse Bactiflow *S. aureus* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts**

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	28725	5491338	7889482
2	10457	742478	4796298
Statistische Angaben			
Mittel	19591	3116908	6342890
SD	12917	3357951	2187211
2 SD	25835	6715902	4374423
Min	10457	742478	4796298
Max	28725	6715902	7889482

Tabelle 82: : Ergebnisse PCR *S. aureus* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	23,51	19,23	16,33
2	24,05	18,53	18,95
Statistische Angaben			
Mittel	23,78	18,88	17,64
SD	0,38	0,49	1,85
2 SD	0,76	0,99	3,71
Min	0,38	0,49	1,85
Max	24,05	19,23	18,95

Tabelle 83: Ergebnisse BacT/ALERT *S. aureus* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,16	3,06	2,96
2	3,08	3,03	2,92
Statistische Angaben			
Mittel	3,1	3,1	2,9
SD	0,7	0,0	0,0
2 SD	0,1	0,0	0,1
Min	3,1	3,0	2,9
Max	3,2	3,1	3,0

Staphylococcus epidermidis

Spikekonzentration 14 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 84: Ergebnisse Bactiflow *S. epidermidis* Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	20495295	21288692	21186011
2	21066851	20973680	21770998
Statistische Angaben			
Mittel	20781073	21131186	21478505
SD	404151	222747	413648
2 SD	808302	445494	827297
Min	20495295	20973680	21186011
Max	21066851	21288692	21770998

Tabelle 85: : Ergebnisse PCR *S. epidermidis* Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	27,41	27,01	17,85
2	27,48	26,45	16,88
Statistische Angaben			
Mittel	27,45	26,73	17,37
SD	0,05	0,40	0,69
2 SD	0,10	0,79	1,37
Min	27,41	26,45	16,88
Max	27,48	27,01	17,85

Tabelle 86: Ergebnisse BacT/ALERT *S. epidermidis* Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,86	4,06	3,72
2	3,92	4,13	3,62
Statistische Angaben			
Mittel	3,9	4,1	3,7
SD	0,0	0,0	0,1
2 SD	0,1	0,1	0,1
Min	3,9	4,1	3,6
Max	3,9	4,1	3,7

5er-Pools:

Tabelle 87: Ergebnisse Bactiflow *S. epidermidis* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	15733980	18170795	17396445
2	21107624	17083854	16728075
Statistische Angaben			
Mittel	18420802	17627325	17062260
SD	3799740	768583	472609
2 SD	7599480	1537167	945218
Min	15733980	17083854	16728075
Max	21107624	18170795	17396445

Tabelle 88: Ergebnisse PCR *S. epidermidis* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	27,65	27,15	18,26
2	28,41	27,32	17,41
Statistische Angaben			
Mittel	28,03	27,24	17,84
SD	0,54	0,12	0,60
2 SD	1,07	0,24	1,20
Min	27,65	27,15	17,41
Max	28,41	27,32	18,26

Tabelle 89: Ergebnisse BacT/ALERT *S. epidermidis* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	4,46	4,16	4,08
2	4,29	4,08	3,84
Statistische Angaben			
Mittel	4,4	4,1	4,0
SD	0,1	0,1	0,2
2 SD	0,2	0,1	0,3
Min	4,3	4,1	3,8
Max	4,5	4,2	4,1

10er-Pools:

Tabelle 90: Ergebnisse Bactiflow *S. epidermidis* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	12274363	15301322	14620368
2	18562619	14577191	14766037
Statistische Angaben			
Mittel	15418491	14939257	14693203
SD	4446468	512038	103004
2 SD	8892937	1024076	206007
Min	12274363	14577191	14620368
Max	18562619	15301322	14766037

Tabelle 91: Ergebnisse PCR *S. epidermidis* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	28,21	27,96	19,06
2	28,56	27,41	18,45
Statistische Angaben			
Mittel	28,39	27,69	18,76
SD	0,25	0,39	0,43
2 SD	0,49	0,78	0,86
Min	28,21	27,41	18,45
Max	28,56	27,96	19,06

Tabelle 92: Ergebnisse BacT/ALERT *S. epidermidis* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	6,05	5,83	5,68
2	5,94	5,94	5,73
Statistische Angaben			
Mittel	6,0	5,9	5,7
SD	0,1	0,1	0,0
2 SD	0,2	0,2	0,1
Min	5,9	5,8	5,7
Max	6,1	5,9	5,7

Streptococcus pyogenes

Spikekonzentration 15 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 93: Ergebnisse Bactiflow *S. pyogenes* Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	23176810	20854170	22051061
2	22033256	21241020	21591332
Statistische Angaben			
Mittel	22605033	21047595	21821197
SD	808615	273544	325077
2 SD	1617230	547089	650155
Min	22033256	20854170	21591332
Max	23176810	21241020	22051061

Tabelle 94: Ergebnisse PCR *S. pyogenes* Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22,75	22,13	23,13
2	22,16	21,46	21,16
Statistische Angaben			
Mittel	22,46	21,80	22,15
SD	0,42	0,47	1,39
2 SD	0,83	0,95	2,79
Min	22,16	21,46	21,16
Max	22,75	22,13	23,13

Tabelle 95: Ergebnisse BacT/ALERT *S. pyogenes* Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,56	3,43	3,29
2	3,48	3,38	3,21
Statistische Angaben			
Mittel	3,5	3,4	3,3
SD	0,1	0,0	0,1
2 SD	0,1	0,1	0,1
Min	3,5	3,4	3,2
Max	3,6	3,4	3,3

5er-Pools:

Tabelle 96: Ergebnisse Bactiflow *S. pyogenes* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	19265517	17493034	17078114
2	17380600	17247956	17015155
Statistische Angaben			
Mittel	18323059	17370495	17046635
SD	1332838	173296	44519
2 SD	2665675	346593	89037
Min	17380600	17247956	17015155
Max	19265517	17493034	17078114

Tabelle 97 Ergebnisse PCR *S. pyogenes* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	23,17	22,46	20,16
2	23,42	20,77	20,54
Statistische Angaben			
Mittel	23,30	21,62	20,35
SD	0,18	1,20	0,27
2 SD	0,35	2,39	0,54
Min	23,17	20,77	20,16
Max	23,42	22,46	20,54

Tabelle 98: Ergebnisse BacT/ALERT *S. pyogenes* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	4,53	4,49	4,16
2	4,16	4,26	4,28
Statistische Angaben			
Mittel	4,3	4,4	4,2
SD	0,3	0,2	0,1
2 SD	0,5	0,3	0,2
Min	4,1	4,3	4,2
Max	4,5	4,5	4,3

10er-Pools:

Tabelle 99: Ergebnisse Bactiflow *S. pyogenes* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	14884997	15060759	14570018
2	14888427	14304521	14965051
Statistische Angaben			
Mittel	14886712	14682640	14767535
SD	2425	534741	279331
2 SD	4851	1069482	558661
Min	14884997	14304521	14570018
Max	14888427	15060759	14965051

Tabelle 100: Ergebnisse PCR *S. pyogenes* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	23,45	22,98	22,44
2	24,16	22,16	21,07
Statistische Angaben			
Mittel	23,81	22,57	21,76
SD	0,50	0,58	0,97
2 SD	1,00	1,16	1,94
Min	23,45	22,16	21,07
Max	24,16	22,98	22,44

Tabelle 101: Ergebnisse BacT/ALERT *S. pyogenes* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	5,76	5,52	4,89
2	5,83	5,06	4,86
Statistische Angaben			
Mittel	5,8	5,3	4,9
SD	0,1	0,3	0,0
2 SD	0,1	0,7	0,0
Min	5,8	5,1	4,9
Max	5,8	5,5	4,9

Bacillus cereus:

Spikekonzentration 15 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 102: Ergebnisse Bactiflow *B. cereus* Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	7007633	11063162	13557987
2	8100228	8238749	12416312
Statistische Angaben			
Mittel	7553931	9650956	12987150
SD	772581	1997162	807286
2 SD	1545163	3994323	1614572
Min	7007633	8238749	12416312
Max	8100228	11063162	13557987

Tabelle 103: Ergebnisse PCR *B. cereus* Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	18,24	16,94	15,64
2	17,46	17,03	15,74
Statistische Angaben			
Mittel	17,85	16,99	15,69
SD	0,55	0,06	0,07
2 SD	1,10	0,13	0,14
Min	17,46	16,94	15,64
Max	18,24	17,03	15,74

Tabelle 104: Ergebnisse BacT/ALERT *B. cereus* Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,46	3,22	3,16
2	3,38	3,25	3,18
Statistische Angaben			
Mittel	3,4	3,2	3,2
SD	0,1	0,0	0,0
2 SD	0,1	0,0	0,0
Min	3,4	3,2	3,2
Max	3,5	3,3	3,2

5er-Pools:

Tabelle 105: Ergebnisse Bactiflow *B. cereus* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	20920	1082959	2468691
2	50560	560240	2096908
Statistische Angaben			
Mittel	35740	821600	2282800
SD	20959	369618	262890
2 SD	41917	739236	525781
Min	20920	560240	2096908
Max	50560	1082959	2468691

Tabelle 106: Ergebnisse PCR *B. cereus* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	18,35	17,26	15,79
2	18,02	17,19	16,05
Statistische Angaben			
Mittel	18,19	17,23	15,92
SD	0,23	0,05	0,18
2 SD	0,47	0,10	0,37
Min	18,02	17,19	15,79
Max	18,35	17,26	16,05

Tabelle 107: Ergebnisse BacT/ALERT *B. cereus* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,86	3,74	3,65
2	3,83	3,71	3,84
Statistische Angaben			
Mittel	3,8	3,7	3,7
SD	0,0	0,0	0,1
2 SD	0,0	0,0	0,3
Min	3,8	3,7	3,7
Max	3,9	3,7	3,8

10er-Pools:

Tabelle 108: Ergebnisse Bactiflow *B. cereus* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	1070	7210	9784
2	317	3842	7645
Statistische Angaben			
Mittel	694	5526	8715
SD	532	2382	1513
2 SD	1065	4763	3025
Min	317	3842	7645
Max	1070	7210	9784

Tabelle 109: Ergebnisse PCR *B. cereus* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	18,67	18,06	16,09
2	18,49	17,59	17,04
Statistische Angaben			
Mittel	18,58	17,83	16,57
SD	0,13	0,33	0,67
2 SD	0,25	0,66	1,34
Min	0,13	0,33	0,67
Max	18,67	18,06	17,04

Tabelle 110: Ergebnisse BacT/ALERT *B. cereus* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	4,26	4,18	4,09
2	4,29	4,14	4,02
Statistische Angaben			
Mittel	4,3	4,2	4,1
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,0	0,1	0,1
Min	4,3	4,1	4,0
Max	4,3	4,2	4,1

Escherichia coli:

Spikekonzentration 13 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 111: Ergebnisse Bactiflow *E. coli* Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22709169	22095049	17406625
2	22759942	22361962	21431894
Statistische Angaben			
Mittel	22734556	22228506	19419260
SD	35902	188736	2846295
2 SD	71804	377472	5692590
Min	22709169	22095049	17406625
Max	22759942	22361962	21431894

Tabelle 112: Ergebnisse PCR *E. coli* Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	21,45	21,21	19,62
2	22,77	22,63	19,45
Statistische Angaben			
Mittel	22,11	21,92	19,54
SD	0,93	1,00	0,12
2 SD	1,87	2,01	0,24
Min	21,45	21,21	19,45
Max	22,77	22,63	19,62

Tabelle 113: Ergebnisse BacT/ALERT *E. coli* Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,28	3,08	2,82
2	3,16	3,04	2,86
Statistische Angaben			
Mittel	3,2	3,1	2,8
SD	0,1	0,0	0,0
2 SD	0,2	0,1	0,1
Min	3,2	3,0	2,8
Max	3,3	3,1	2,9

5er-Pools:

Tabelle 114: Ergebnisse Bactiflow *E. coli* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	21849409	22987705	8542572
2	21365018	22686203	23076329
Statistische Angaben			
Mittel	21607214	22836954	15809451
SD	342516	213194	10276918
2 SD	685032	426388	20553836
Min	21365018	22686203	8542572
Max	21849409	22987705	23076329

Tabelle 115: Ergebnisse PCR *E. coli* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22,15	21,54	19,54
2	23,16	22,11	20,72
Statistische Angaben			
Mittel	22,66	21,83	20,13
SD	0,71	0,40	0,83
2 SD	1,43	0,81	1,67
Min	22,15	21,54	19,54
Max	23,16	22,11	20,72

Tabelle 116: Ergebnisse BacT/ALERT *E. coli* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,92	3,85	3,76
2	3,98	3,81	3,72
Statistische Angaben			
Mittel	4,0	3,8	3,7
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,1	0,1	0,1
Min	3,9	3,8	3,7
Max	4,0	3,9	3,8

10er-Pools:

Tabelle 117: Ergebnisse Bactiflow *E. coli* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	20248831	21808808	4233392
2	19123735	21622359	22639865
Statistische Angaben			
Mittel	19686283	21715584	13436629
SD	795563	131839	13015342
2 SD	1591126	263679	26030684
Min	19123735	21622359	4233392
Max	20248831	21808808	26030684

Tabelle 118: Ergebnisse PCR *E. coli* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22,65	21,56	20,46
2	22,99	22,63	20,77
Statistische Angaben			
Mittel	22,82	22,10	20,62
SD	0,24	0,76	0,22
2 SD	0,48	1,51	0,44
Min	22,65	21,56	20,46
Max	22,99	22,63	20,77

Tabelle 119: Ergebnisse BacT/ALERT *E. coli* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	4,72	4,53	4,48
2	4,76	4,51	4,41
Statistische Angaben			
Mittel	4,7	4,5	4,4
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,1	0,0	0,1
Min	4,7	4,5	4,4
Max	4,8	4,5	4,5

Klebsiella pneumoniae:

Spikekonzentration 10 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 120: Ergebnisse Bactiflow *K. pneumoniae* Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22978539	23145950	22950927
2	22833365	22900983	22835763
Statistische Angaben			
Mittel	22905952	23023467	22893345
SD	102654	173218	81433
2 SD	205307	346436	162866
Min	22833365	22900983	22835763
Max	22978539	23145950	22950927

Tabelle 121: Ergebnisse PCR *K. pneumoniae* Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	18,88	16,52	13,06
2	18,75	16,03	13,11
Statistische Angaben			
Mittel	18,82	16,28	13,09
SD	0,09	0,35	0,04
2 SD	0,18	0,69	0,07
Min	18,75	16,03	13,06
Max	18,88	16,52	13,11

Tabelle 122: Ergebnisse BacT/ALERT *K. pneumoniae* Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2,06	1,96	1,86
2	2,03	1,99	1,83
Statistische Angaben			
Mittel	2,0	2,0	1,8
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,0	0,0	0,0
Min	2,0	2,0	1,8
Max	2,1	2,0	1,9

5er-Pools:

Tabelle 123: Ergebnisse Bactiflow *K. pneumoniae* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	19199485	20968305	21708727
2	21388274	21813606	22317685
Statistische Angaben			
Mittel	20293880	21390956	22013206
SD	1547708	597718	430598
2 SD	3095415	1195436	861197
Min	19199485	20968305	21708727
Max	21388274	21813606	22317685

Tabelle 124: Ergebnisse PCR *K. pneumoniae* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	18,59	17,04	12,99
2	19,54	16,23	13,26
Statistische Angaben			
Mittel	19,07	16,64	13,13
SD	0,67	0,57	0,19
2 SD	1,34	1,15	0,38
Min	18,59	16,23	12,99
Max	19,54	17,04	13,26

Tabelle 125: Ergebnisse BacT/ALERT *K. pneumoniae* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2,59	2,33	2,18
2	2,64	2,26	2,16
Statistische Angaben			
Mittel	2,6	2,3	2,2
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,1	0,1	0,0
Min	2,6	2,3	2,2
Max	2,6	2,3	2,2

10er-Pools:

Tabelle 126: Ergebnisse Bactiflow *K. pneumoniae* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	15966557	18113028	19183867
2	17545369	18597733	19832710
Statistische Angaben			
Mittel	16755963	18355381	19508289
SD	1116389	342738	458801
2 SD	2232777	685476	917603
Min	15966557	18113028	19183867
Max	17545369	18597733	19832710

Tabelle 127: Ergebnisse PCR *K. pneumoniae* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	19,52	17,52	13,44
2	20,16	17,02	13,06
Statistische Angaben			
Mittel	19,84	17,27	13,25
SD	0,45	0,35	0,27
2 SD	0,91	0,71	0,54
Min	19,52	17,02	13,06
Max	20,16	17,52	13,44

Tabelle 128: Ergebnisse BacT/ALERT *K. pneumoniae* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,42	3,33	3,24
2	3,49	3,38	3,20
Statistische Angaben			
Mittel	3,5	3,4	3,2
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,1	0,1	0,1
Min	3,4	3,3	3,2
Max	3,5	3,4	3,2

Serratia marcescens:

Spikekonzentration 17 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 129: Ergebnisse Bactiflow *S. marcescens* Einzelmessungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	22706219	21272331	22889685
2	22780770	21805648	22747745
Statistische Angaben			
Mittel	22743495	21538990	22818715
SD	52716	377112	100367
2 SD	105431	754224	200733
Min	22706219	21272331	22747745
Max	22780770	21805648	22889685

Tabelle 130: Ergebnisse PCR *S. marcescens* Einzelmessungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	15,48	14,56	14,09
2	16,49	14,48	14,27
Statistische Angaben			
Mittel	15,99	14,52	14,18
SD	0,71	0,06	0,13
2 SD	1,43	0,11	0,25
Min	15,48	14,48	14,09
Max	16,49	14,56	14,27

Tabelle 131: Ergebnisse Bact/ALERT *S. marcescens* Einzelmessungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	2,58	2,42	2,36
2	2,51	2,48	2,31
Statistische Angaben			
Mittel	2,5	2,5	2,3
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,1	0,1	0,1
Min	2,5	2,4	2,3
Max	2,6	2,5	2,4

5er-Pools:

Tabelle 132: Ergebnisse Bactiflow *S. marcescens* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	19141775	19721488	20455520
2	19227538	19817993	20215112
Statistische Angaben			
Mittel	19184657	19769741	20335316
SD	60644	68239	169994
2 SD	121287	136479	339988
Min	19141775	19721488	20215112
Max	19227538	19817993	20455520

Tabelle 133: Ergebnisse PCR *S. marcescens* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	15,78	14,86	14,56
2	17,04	15,06	14,32
Statistische Angaben			
Mittel	16,41	14,96	14,44
SD	0,89	0,14	0,17
2 SD	1,78	0,28	0,34
Min	15,78	14,86	14,32
Max	17,04	15,06	14,56

Tabelle 134: Ergebnisse BacT/ALERT *S. marcescens* 5er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	3,25	3,18	3,05
2	3,21	3,22	3,08
Statistische Angaben			
Mittel	3,2	3,2	3,1
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,1	0,1	0,0
Min	3,2	3,2	3,1
Max	3,3	3,2	3,1

10er-Pools:

Tabelle 135: Ergebnisse Bactiflow *S. marcescens* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Counts

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	15955882	15920875	17464641
2	16134037	16466011	17404620
Statistische Angaben			
Mittel	16044960	16193443	17434631
SD	125975	385469	42441
2 SD	251949	770939	84883
Min	15955882	15920875	17404620
Max	16134037	16466011	17464641

Tabelle 136: Ergebnisse PCR *S. marcescens* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	16,04	15,85	15,26
2	17,46	16,32	15,92
Statistische Angaben			
Mittel	16,75	16,09	15,59
SD	1,00	0,33	0,47
2 SD	2,01	0,66	0,93
Min	16,04	15,85	15,26
Max	17,46	16,32	15,92

Tabelle 137: Ergebnisse BacT/ALERT *S. marcescens* 10er-Pool-Messungen Apherese-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 2	Tag 3	Tag 4
1	4,06	3,94	3,82
2	4,12	3,91	3,86
Statistische Angaben			
Mittel	4,1	3,9	3,8
SD	0,0	0,0	0,0
2 SD	0,1	0,0	0,1
Min	4,1	3,9	3,8
Max	4,1	3,9	3,9

Gesamtauswertung Apherese:

Ein qualitativer Nachweis der gespikten Bakterien wurde durch das Institut für medizinische Mikrobiologie für alle Proben erfolgreich durchgeführt.

Alle sieben transfusionsmedizinisch relevanten Bakterienkeime wurden von der Bactiflow-, der PCR- und auch von der BacT/ALERT-Methode (bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden) korrekt analysiert. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen im synoptischen Vergleich die qualitative Auswertung der untersuchten Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von der Poolgröße und von den Untersuchungstagen. Die Analyse der Rohdaten zeigt in allen Methoden, dass eine Einzelprobenbestimmung, eine Bestimmung in 5er-Mini-Pools aber auch in 10er-Mini-Pools grundsätzlich möglich ist. Obgleich alle Proben auch in 10er-Minipools ein positives Ergebnis erzielten, wird anhand einer reduzierten Count-Anzahl in der Bactiflow-Methode, höherer CT-Werte in der PCR-Methode und auch einer längeren Bebrütungszeit in der BacT/ALERT Methode deutlich, dass die analytische Sensitivität durch die Verdünnung in Minipools gegenüber einer individuellen Bestimmung reduziert wird. Es gab keine qualitativen Unterschiede bezüglich der Pool-TK und der Apherese-TK-Messungen. Insgesamt zeigte sich bei Apheresen für Bactiflow durchschnittlich eine etwas niedrigere Bakterienzahl, als bei Pool-TKs, dafür aber weniger Abweichungen vom grundsätzlichen Verlauf der CT-Werte bei der PCR. Keiner dieser Fakten war ergebnisrelevant. Damit bestehen keine Hinweise auf einen Matrix-Effekt. Alle BacT/ALERT-Proben konnten in einem Zeitraum von maximal 11,28 Stunden ein Bakterienwachstum nachweisen. Die Poolproben waren dabei jeweils etwas später positiv als die Einzelproben, was jedoch keinen Einfluss auf die Sicherheit der Methode hatte.

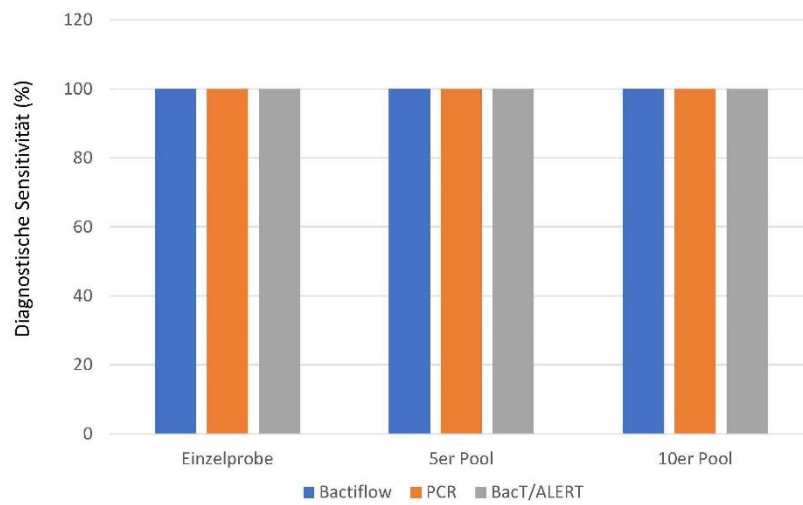


Abbildung 11: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von der Poolgröße bei Apherese-TKs

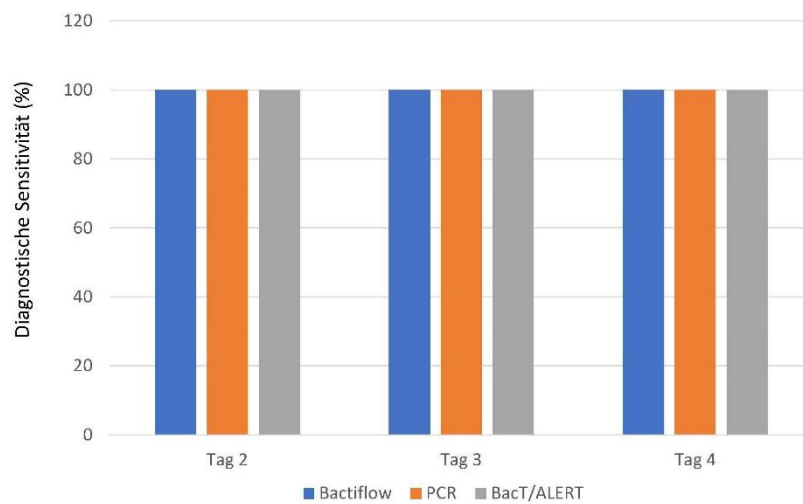


Abbildung 12: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von dem Untersuchungstag bei Apherese-TKs

3.3 Transportvalidierung

Für die Transportvalidierung wurden vier transfusionsmedizinisch relevante Bakterienstämme ausgewählt. Die Bakterien wurden in Pool-TK Konzentrate mit einer Zielkonzentration von 10 CFU/ Beutel gespikt. Nach 96h wurden Proben entnommen und mit allen drei Schnelltestverfahren (Bactiflow, PCR und BacT/ALERT) untersucht. Anschließend wurden die Proben in Transportröhrchen zum einen für 24h bei Raumtemperatur (RT) und zum anderen für 24h bei 4°C (2°C – 8°C) aufbewahrt. Nach der Inkubationszeit erfolgte erneut eine Untersuchung mit allen drei Schnelltestmethoden. Alle Versuche wurden in fünf Replikaten durchgeführt.

Staphylococcus epidermidis:

Spikekonzentration 12 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 138: Ergebnisse Bactiflow *S. epidermidis* Einzelmessungen Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	20166732	21653342	18443255
2	19887542	20553421	16678345
3	18778445	20894532	17663422
4	20001765	19400232	18344523
5	19045673	18334655	17030552
Statistische Angaben			
Mittel	19576031	20167236	17632019
SD	621418	1307025	780706
2 SD	1242835	2614050	1561412
Min	18778445	18334655	16678345
Max	20166732	21653342	18443255

Tabelle 139: Ergebnisse PCR *S. epidermidis* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	16,85	15,63	15,82
2	16,73	15,77	15,67
3	16,68	15,81	15,79
4	16,92	15,53	15,63
5	16,96	15,64	15,76
Statistische Angaben			
Mittel	16,83	15,68	15,73
SD	0,12	0,11	0,08
2 SD	0,24	0,23	0,16
Min	16,73	15,63	15,63
Max	16,96	15,81	15,82

Tabelle 140: Ergebnisse BacT/ALERT *S. epidermidis* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	4,55	4,09	4,12
2	4,21	4,13	4,24
3	3,89	3,98	4,17
4	4,35	3,86	4,09
5	4,11	4,07	4,27
Statistische Angaben			
Mittel	4,2	4,0	4,2
SD	0,2	0,1	0,1
2 SD	0,5	0,2	0,2
Min	3,9	3,9	4,1
Max	4,6	4,1	4,3

5er-Pools:

Tabelle 141: Ergebnisse Bactiflow *S. epidermidis* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	12465723	14443778	12776882
2	10934552	14003782	13411332
3	11334567	13843266	13882379
4	10288734	13932277	10983223
5	11455267	15303554	11772344
Statistische Angaben			
Mittel	11295769	14305331	12565232
SD	796921	603991	1186063
2 SD	1593843	1207983	2372126
Min	10288734	13843266	10983223
Max	12465723	15303554	13882379

Tabelle 142: Ergebnisse PCR *S. epidermidis* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	17,58	16,26	16,37
2	17,61	16,34	16,42
3	17,48	16,52	16,11
4	17,73	16,47	16,29
5	17,59	16,29	16,34
Statistische Angaben			
Mittel	17,60	16,38	16,31
SD	0,09	0,11	0,12
2 SD	0,18	0,23	0,24
Min	17,48	16,26	16,11
Max	17,73	16,52	16,42

Tabelle 143: Ergebnisse BacT/ALERT *S. epidermidis* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	4,35	4,89	5,17
2	4,29	5,02	5,06
3	4,48	5,12	5,28
4	4,62	5,09	5,16
5	4,48	5,22	5,07
Statistische Angaben			
Mittel	4,4	5,1	5,1
SD	0,1	0,1	0,1
2 SD	0,3	0,2	0,2
Min	4,3	4,9	5,1
Max	4,6	5,2	5,3

10er-Pools:

Tabelle 144: Ergebnisse Bactiflow *S. epidermidis* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	8101245	7552314	6232155
2	7334264	6445232	7033244
3	9455206	7442155	6855262
4	7226455	7068953	5995232
5	8661232	6652341	6441225
Statistische Angaben			
Mittel	8155680	7032199	6511424
SD	933474	481860	430085
2 SD	1866949	963720	860171
Min	7226455	6445232	5995232
Max	9455206	7552314	7033244

Tabelle 145: Ergebnisse PCR *S. epidermidis* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	18,35	17,59	17,62
2	18,29	17,49	17,38
3	18,49	17,68	17,44
4	18,51	17,38	17,42
5	18,29	17,45	17,69
Statistische Angaben			
Mittel	18,39	17,52	17,51
SD	0,11	0,12	0,14
2 SD	0,21	0,24	0,27
Min	18,29	17,45	17,38
Max	18,51	17,68	17,69

Tabelle 146: Ergebnisse BacT/ALERT *S. epidermidis* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	5,26	6,03	6,21
2	5,67	5,84	6,25
3	5,84	6,12	6,05
4	6,02	6,05	5,86
5	5,67	6,17	5,92
Statistische Angaben			
Mittel	5,7	6,0	6,1
SD	0,3	0,1	0,2
2 SD	0,6	0,3	0,3
Min	5,3	5,8	5,9
Max	6,0	6,2	6,3

Bacillus cereus:

Spikekonzentration 14 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 147: Ergebnisse Bactiflow *B. cereus* Einzelmessungen Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	14253687	15633247	13448512
2	13552634	14586965	13628596
3	14586953	15874221	14274553
4	12547326	16532447	10263524
5	13226854	15685421	12475845
Statistische Angaben			
Mittel	13633491	15662460	12818206
SD	813231	699963	1566730
2 SD	1626462	1399925	3133461
Min	12547326	14586965	10263524
Max	14586953	16532447	14274553

Tabelle 148: Ergebnisse PCR *B. cereus* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	15,64	14,49	14,62
2	15,28	14,28	14,53
3	15,49	14,37	14,49
4	15,33	14,45	14,35
5	15,38	14,41	14,48
Statistische Angaben			
Mittel	15,42	14,40	14,49
SD	0,14	0,08	0,10
2 SD	0,29	0,16	0,20
Min	15,28	14,28	14,35
Max	15,64	14,49	14,62

Tabelle 149: Ergebnisse BacT/ALERT *B. cereus* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	2,4	2,1	2,2
2	2,6	1,8	2,5
3	2,1	2,3	2,3
4	2,3	2,1	2,4
5	2,5	1,9	2,4
Statistische Angaben			
Mittel	2,4	2,0	2,4
SD	0,2	0,2	0,1
2 SD	0,4	0,4	0,2
Min	2,1	1,8	2,2
Max	2,6	2,3	2,5

5er-Pools:

Tabelle 150: Ergebnisse Bactiflow *B. cereus* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	10265452	12412332	9441253
2	9265531	13201254	10265353
3	11245784	12520324	11254326
4	10632547	10524623	9626551
5	9632545	11245858	9235142
Statistische Angaben			
Mittel	10208372	11980878	9964525
SD	787390	1075570	817637
2 SD	1574780	2151140	1635275
Min	9265531	10524623	9235142
Max	11245784	13201254	11254326

Tabelle 151: Ergebnisse PCR *B. cereus* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	16,24	15,26	15,34
2	16,52	15,37	15,31
3	16,38	15,48	15,21
4	16,49	15,29	15,46
5	16,27	15,39	15,57
Statistische Angaben			
Mittel	16,38	15,36	15,38
SD	0,13	0,09	0,14
2 SD	0,25	0,17	0,28
Min	16,24	15,26	15,21
Max	16,52	15,48	15,57

Tabelle 152: Ergebnisse BacT/ALERT *B. cereus* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	3,2	2,5	3,3
2	3,4	2,9	3,1
3	3,1	3,1	3,6
4	2,9	2,7	3,4
5	2,8	2,8	3,5
Statistische Angaben			
Mittel	3,1	2,8	3,4
SD	0,2	0,2	0,2
2 SD	0,5	0,4	0,4
Min	2,8	2,5	3,1
Max	3,4	3,1	3,6

10er-Pools:

Tabelle 153: Ergebnisse Bactiflow *B. cereus* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	7232566	9221446	7454221
2	8441221	9030210	6020331
3	7035662	8566235	6552345
4	8556331	7956254	6121114
5	7050263	8623445	6852214
Statistische Angaben			
Mittel	7663209	8679518	6600045
SD	767779	488815	583293
2 SD	1535559	977629	1166587
Min	7035662	7956254	6020331
Max	8556331	9221446	7454221

Tabelle 154: Ergebnisse PCR *B. cereus* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	17,28	16,41	16,19
2	17,49	16,29	16,38
3	17,32	16,37	16,52
4	17,38	16,18	16,67
5	17,46	16,25	16,27
Statistische Angaben			
Mittel	17,39	16,30	16,41
SD	0,09	0,09	0,19
2 SD	0,18	0,18	0,39
Min	17,28	16,18	16,19
Max	17,49	16,41	16,67

Tabelle 155: Ergebnisse BacT/ALERT *B. cereus* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	3,9	3,5	4,2
2	4,2	3,3	4,3
3	4,3	3,2	4,5
4	3,8	3,6	4,4
5	3,7	3,4	3,8
Statistische Angaben			
Mittel	4,0	3,4	4,2
SD	0,3	0,2	0,3
2 SD	0,5	0,3	0,5
Min	3,7	3,2	3,8
Max	4,3	3,6	4,5

Klebsiella pneumoniae:

Spikekonzentration 10 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 156: Ergebnisse Bactiflow *K. pneumoniae* Einzelmessungen Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	18552364	21478547	18263547
2	19552341	20325685	17458956
3	20101245	19536524	18020324
4	18332101	22303142	17425630
5	19454241	21475842	18250142
Statistische Angaben			
Mittel	19198458	21023948	17883720
SD	737173	1089404	414568
2 SD	1474345	2178809	829135
Min	18332101	19536524	17425630
Max	20101245	22303142	18263547

Tabelle 157: Ergebnisse PCR *K. pneumoniae* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	19,43	19,21	19,58
2	18,93	19,34	19,21
3	18,85	19,09	12,95
4	19,21	19,11	12,41
5	18,95	19,09	12,53
Statistische Angaben			
Mittel	19,07	19,17	15,34
SD	0,24	0,11	3,71
2 SD	0,48	0,22	7,43
Min	18,85	19,09	12,41
Max	19,43	19,34	19,58

Tabelle 158: Ergebnisse BacT/ALERT *K. pneumoniae* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	2,3	2,1	2,4
2	2,1	1,7	2,1
3	1,9	1,8	2,3
4	2,4	1,7	1,9
5	2,3	1,9	2,2
Statistische Angaben			
Mittel	2,2	1,8	2,2
SD	0,2	0,2	0,2
2 SD	0,4	0,3	0,4
Min	1,9	1,7	1,9
Max	2,4	2,1	2,4

5er-Pools:

Tabelle 159: Ergebnisse Bactiflow *K. pneumoniae* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	14521365	15263475	12435862
2	15302145	15032475	13320653
3	12247854	16302415	12758946
4	13268954	14956325	11245223
5	14921452	15624758	16254715
Statistische Angaben			
Mittel	14052354	15435890	13203080
SD	1265624	549770	1867176
2 SD	2531248	1099541	3734352
Min	12247854	14956325	11245223
Max	15302145	16302415	16254715

Tabelle 160: Ergebnisse PCR *K. pneumoniae* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	20,47	19,56	19,26
2	21,13	19,72	19,33
3	20,08	19,26	19,11
4	21,29	20,34	19,58
5	20,96	19,85	19,62
Statistische Angaben			
Mittel	20,79	19,75	19,38
SD	0,50	0,40	0,22
2 SD	1,00	0,80	0,43
Min	20,08	19,26	19,11
Max	21,29	20,34	19,62

Tabelle 161: Ergebnisse BacT/ALERT *K. pneumoniae* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	2,6	2,1	2,3
2	2,4	2,3	2,6
3	2,5	2,2	2,4
4	2,5	1,9	2,1
5	2,6	2,2	2,3
Statistische Angaben			
Mittel	2,5	2,1	2,3
SD	0,1	0,2	0,2
2 SD	0,2	0,3	0,4
Min	2,4	1,9	2,1
Max	2,6	2,3	2,6

10er-Pools:

Tabelle 162: Ergebnisse Bactiflow *K. pneumoniae* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	9655214	11264552	8563212
2	8535264	10325647	9554269
3	8324102	10263541	10263547
4	9678522	13201452	9300124
5	10234567	11268954	9478562
Statistische Angaben			
Mittel	9285534	11264829	9431943
SD	818386	1186925	608435
2 SD	1636772	2373851	1216870
Min	8324102	10263541	8563212
Max	10234567	13201452	10263547

Tabelle 163: Ergebnisse PCR *K. pneumoniae* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	21,49	20,59	20,86
2	21,33	20,61	20,25
3	21,59	20,48	20,49
4	21,18	20,38	20,47
5	21,27	20,72	20,31
Statistische Angaben			
Mittel	21,37	20,56	20,48
SD	0,17	0,13	0,24
2 SD	0,33	0,26	0,48
Min	21,18	20,38	20,25
Max	21,59	20,72	20,86

Tabelle 164: Ergebnisse BacT/ALERT *K. pneumoniae* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	3,1	2,5	3,4
2	2,8	2,6	3,2
3	3,3	2,9	3,1
4	3,2	2,7	2,9
5	2,7	2,8	3,3
Statistische Angaben			
Mittel	3,0	2,7	3,2
SD	0,3	0,2	0,2
2 SD	0,5	0,3	0,4
Min	2,7	2,5	2,9
Max	3,3	2,9	3,4

Streptococcus marcescens:

Spikekonzentration 15 CFU/Beutel

Einzelmessungen:

Tabelle 165: Ergebnisse Bactiflow *S. marcescens* Einzelmessungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	18234566	19322561	18467832
2	17346788	18266347	17893432
3	20234553	20111231	19878324
4	19783423	18378943	20118734
5	18782344	19387943	19873432
Statistische Angaben			
Mittel	18876335	19093405	19246351
SD	1164880	769694	998769
2 SD	2329760	1539388	1997537
Min	17346788	18266347	17893432
Max	20234553	20111231	20118734

Tabelle 166: Ergebnisse PCR *S. marcescens* Einzelmessungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	13,68	12,78	12,67
2	13,49	12,59	12,59
3	13,28	12,64	12,82
4	13,37	12,73	12,73
5	13,55	12,79	12,63
Statistische Angaben			
Mittel	13,47	12,71	12,69
SD	0,16	0,09	0,09
2 SD	0,31	0,18	0,18
Min	13,28	12,59	12,59
Max	13,68	12,79	12,82

Tabelle 167: Ergebnisse BacT/ALERT *S. marcescens* Einzelmessungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	2,1	2,3	2,4
2	2,2	2,1	2,5
3	1,9	1,9	2,2
4	2,3	1,8	2,1
5	2,2	1,8	2,3
Statistische Angaben			
Mittel	2,1	2,0	2,3
SD	0,2	0,2	0,2
2 SD	0,3	0,4	0,3
Min	1,9	1,8	2,1
Max	2,3	2,3	2,5

5er-Pools:

Tabelle 168: Ergebnisse Bactiflow *S. marcescens* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	14336473	15788321	12877454
2	13789645	15002343	13784532
3	14789323	14872321	13553421
4	12788942	16789321	12788432
5	12784654	14789322	11004324
Statistische Angaben			
Mittel	13697807	15448326	12801633
SD	903828	848356	1091732
2 SD	1807656	1696712	2183465
Min	12784654	14789322	11004324
Max	14789323	16789321	13784532

Tabelle 169: Ergebnisse PCR *S. marcescens* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	14,68	13,59	13,49
2	14,38	13,41	13,18
3	14,49	13,11	13,22
4	14,52	13,29	13,37
5	14,67	13,62	13,25
Statistische Angaben			
Mittel	14,55	13,40	13,30
SD	0,13	0,21	0,13
2 SD	0,25	0,43	0,25
Min	14,38	13,11	13,18
Max	14,68	13,62	13,49

Tabelle 170: Ergebnisse BacT/ALERT *S. marcescens* 5er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	2,6	2,8	3,1
2	2,4	2,7	2,8
3	2,5	2,9	2,9
4	2,3	2,8	3,2
5	2,6	2,9	2,7
Statistische Angaben			
Mittel	2,5	2,8	2,9
SD	0,1	0,1	0,2
2 SD	0,3	0,2	0,4
Min	2,3	2,7	2,7
Max	2,6	2,9	3,2

10er-Pools:

Tabelle 171: Ergebnisse Bactiflow *S. marcescens* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Counts

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	9332401	8224366	7345521
2	10678233	8243871	7143876
3	8932123	9113435	8254367
4	10109873	7898324	7983422
5	9332347	8018764	8432233
Statistische Angaben			
Mittel	9676995	8299752	7831884
SD	703957	477228	563866
2 SD	1407914	954455	1127732
Min	8932123	7898324	7143876
Max	10678233	9113435	8432233

Tabelle 172: Ergebnisse PCR *S. marcescens* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in CT-Werten

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	15,26	14,62	14,59
2	15,84	14,39	14,29
3	15,27	14,42	14,37
4	15,67	14,72	14,48
5	15,72	14,63	14,42
Statistische Angaben			
Mittel	15,55	14,56	14,43
SD	0,27	0,14	0,11
2 SD	0,54	0,29	0,23
Min	15,26	14,39	14,29
Max	15,84	14,72	14,59

Tabelle 173: Ergebnisse Bact/ALERT *S. marcescens* 10er-Pool Messungen Pool-TKs in Stunden (aerobe Flaschen)

Probe	Tag 4	Tag 5 RT	Tag 5 4°C
1	2,8	2,7	3,2
2	2,7	2,6	2,9
3	2,9	2,8	3,1
4	3,2	2,9	3,4
5	3,1	2,7	3,2
Statistische Angaben			
Mittel	2,9	2,7	3,2
SD	0,2	0,1	0,2
2 SD	0,4	0,2	0,4
Min	2,7	2,6	2,9
Max	3,2	2,9	3,4

Gesamtauswertung Transportvalidierung:

Alle vier transfusionsmedizinisch relevanten Bakterienkeime wurden im Rahmen der Transportvalidierung von der Bactiflow-, der PCR- und auch von der Bact/ALERT-Methode (bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden) korrekt analysiert. Obgleich sowohl eine Lagerung bei 2°C bis 8°C als auch eine Lagerung bei Raumtemperatur für alle bakterielle Methoden geeignet ist, zeigen die Rohdaten bei einer Lagerung bei Raumtemperatur höhere Werte, sodass für den Transport eine Lagerungstemperatur bei Raumtemperatur zu bevorzugen ist. Die Abbildungen 13 und 14 stellen im synoptischen Vergleich die qualitative Auswertung der untersuchten Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von der Poolgröße und von den Untersuchungstagen dar. Die Analyse der Rohdaten zeigt in allen Methoden, dass eine Einzelprobentestung, eine Testung in 5er-Mini-Pools, aber auch in 10er-Mini-Pools grundsätzlich möglich ist. Obgleich alle Proben auch in 10er-Mini-Pools ein positives Ergebnis erzielten, wird anhand einer reduzierten Count-Anzahl in der Bactiflow-Methode, höherer CT-Werte in der PCR-Methode und auch einer längeren Bebrütungszeit in der Bact/ALERT-Methode deutlich, dass die analytische Sensitivität durch die Verdünnung in Minipools gegenüber einer individuellen Testung reduziert wird.

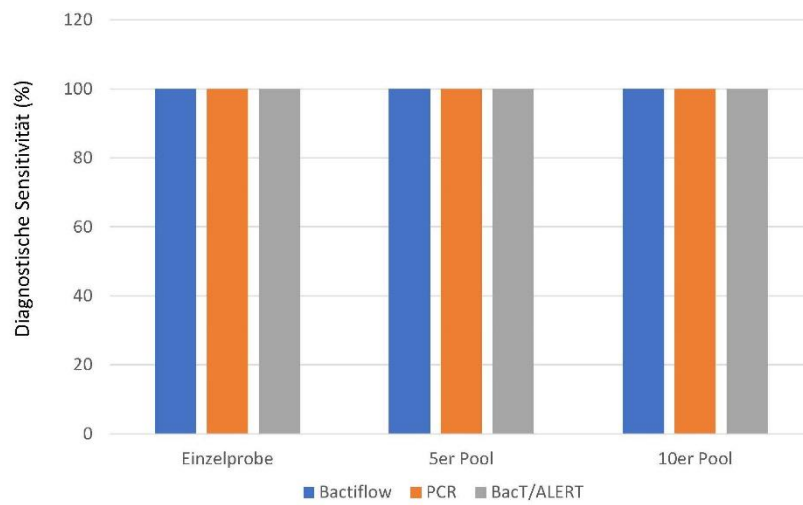


Abbildung 13: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von der Poolgröße bei Pool-TKs

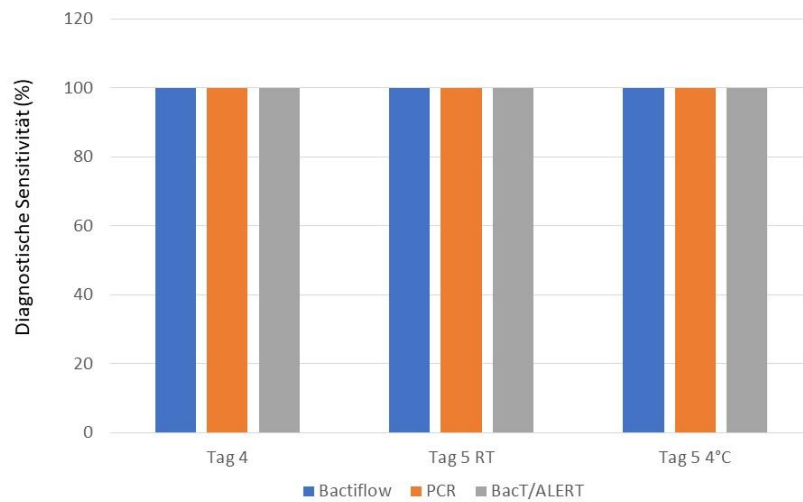


Abbildung 14: Vergleich der diagnostischen Sensitivität von verschiedenen Schnelltestmethoden in Abhängigkeit von dem Untersuchungstag bei Pool-TKs

3.4 Auswertung der Routinedaten

Basierend auf den Labordaten der vorliegenden Promotionsarbeit wurde das Bactiflow-Verfahren im Jahr 2016 in den Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen und dem Blutspendedienst Nord-Ost nach intensiver Prüfung durch die Bundesoberbehörde und sechs Landesbehörden in das Spenderscreening eingeführt. Eine Probe wird dabei frühestens 48h nach der Blutspende gewonnen und anschließend mit dem Bactiflow-Verfahren in Einzelproben, 5er-Pools oder 10er-Pools analysiert.

In den letzten vier Jahren wurden 111.592 von insgesamt 575.091 hergestellten Thrombozytenkonzentraten mit dem Bactiflow-Verfahren untersucht (19,4%). Die Abbildungen 14 und 15 zeigen den zeitlichen Verlauf über die untersuchten Thrombozytenkonzentrate sowie die Ergebnisse der Bactiflow-Testungen.

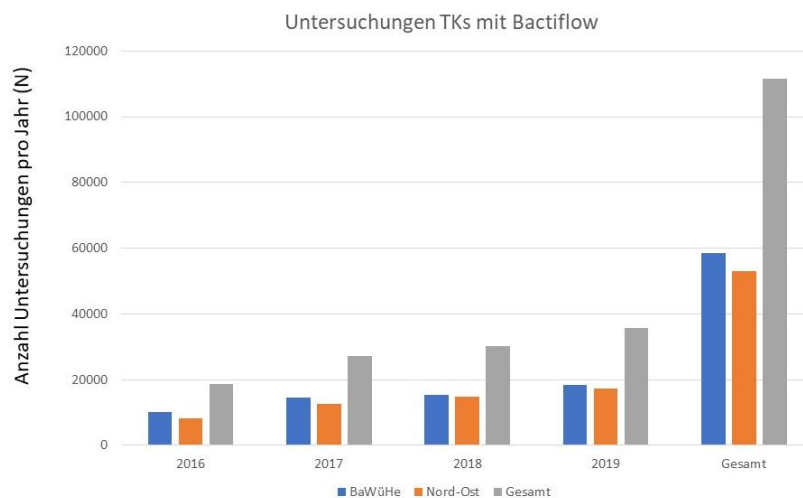


Abbildung 15: Anzahl der Thrombozytenkonzentrate, die mit dem Bactiflow-Verfahren untersucht wurden

Legende: Die Abbildung zeigt die Anzahl der Thrombozytenkonzentrate, die auf eine bakterielle Kontamination mit dem Bactiflow Verfahren untersucht wurden. Insgesamt wurden 111.592 Thrombozytenkonzentrate zwischen 2016 und 2019 untersucht. Davon wurden 58.554 in Baden-Württemberg – Hessen und 53.038 in Nord-Ost.

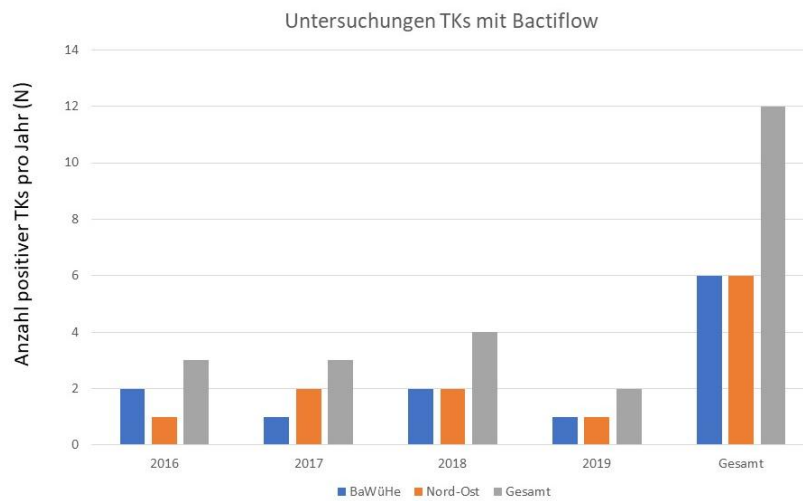


Abbildung 16: Anzahl der Bactiflow positiven Thrombozytenkonzentrate

Legende: In den Jahren 2016 bis 2019 wurden insgesamt 12 Thrombozytenkonzentrate mit einer bakteriellen Kontamination detektiert. Damit ergibt sich eine Inzidenzrate von 1:9.299.

Die folgende Tabelle 174 zeigt die Bakterienspezies, die durch die Bactiflow-Testung detektiert wurden.

Tabelle 174: Durch Bactiflow detektierte Bakterienspezies

Jahr	Keim
2016	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2016	<i>Staphylococcus aureus</i>
2016	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
2017	<i>Streptococcus pyogenes</i>
2017	<i>Staphylococcus aureus</i>
2017	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2018	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2018	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2018	<i>Bacillus cereus</i>
2018	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2019	<i>Staphylococcus aureus</i>
2019	<i>Bacillus cereus</i>

4 DISKUSSION

Die Zusammenschau der Ergebnisse zeigt, dass aufgrund der steilen Wachstumskurven von transfusionsmedizinisch relevanten Keimen ein Screening mit bakteriellen Schnelltestmethoden möglich und sinnvoll ist. Es konnte gezeigt werden, dass als bakterielle Schnelltestmethoden sowohl das Bactiflow-Verfahren, eine generische 16s PCR-Methode als auch ein Kulturverfahren (BacT/ALERT) geeignet sind, transfusionsmedizinisch relevante, schnell wachsende Keime in der Einzelproben- testung, im 5er- Mini-Pool als auch im 10er-Mini-Pool nachzuweisen. Auch ein Versand der Untersuchungsproben von dezentralen Instituten nach Frankfurt führt zu validen Ergebnissen, wenn die Proben entweder bei Raumtemperatur oder bei 2°C – 8°C gelagert werden.

4.1 Transfusionszwischenfälle

Bei den dargestellten Transfusionszwischenfällen konnten die Bakterien sowohl im Thrombozytenkonzentrat als auch im Patienten nachgewiesen werden. Damit besteht der Verdacht eines ursächlichen Zusammenhangs in Bezug auf eine transfusions- bedingte bakterielle Übertragung von Bakterien. Die erstellten Wachstumskurven zu den jeweils nachgewiesenen Keimen zeigen, dass *Klebsiella pneumoniae* (mehr, als 10.000-fache Vermehrung) und *Streptococcus dysgalacticae* (ca. 1.000-fache Vermehrung) innerhalb von 24 h eine für den menschlichen Organismus schädliche Konzentration erreichen. Bei *Staphylococcus epidermidis* ist dies innerhalb der ersten 48 h der Fall.

Auffällig ist, dass alle Zwischenfälle durch Pool-TKs verursacht wurden. Mögliche, jedoch nicht sichere, Erklärungsansätze hierfür könnten eine Risikoerhöhung der Hautkeimkontamination sowohl durch die Zusammengabe von 6-8 Spenden, von denen jede einzelne als Quelle in Frage kommen kann als auch im Poolingprozess, zum Beispiel durch Kontakt mit Hautkeimen von Mitarbeitern, liegen. Ersteres wird jedoch durch eine Studie von Schrezenmeier et. al. widerlegt, die sogar eine etwas niedrigere Kontaminationswahrscheinlichkeit von Pool-TKs ergab.⁶² Es gilt auch zu bedenken, dass

ein Vollblutspender mit asymptomatischer Bakteriämie maximal viermal im Jahr Blut spenden kann. Ein Apheresespende kommt jedoch für bis zu 50 Apherese in Betracht.

Bei der Übertragung von Bakterien durch Blutprodukte spielt auch immer die immunologische Situation des Empfängers eine wesentliche Rolle. Werden Bakterien vom Immunsystem immunkompetenter Menschen in der Regel innerhalb von wenigen Stunden phagozytiert, können sich die Bakterien bei schwer kranken Patienten weiter vermehren und somit das klinische Bild einer Sepsis entwickeln.

Eine Ursache kann eine ungenügende Hautdesinfektion bei der Blutentnahme sein. Daher werden alle Entnahmemitarbeiter regelmäßig über eine suffiziente Hautdesinfektion geschult. Ferner wurden als „corrective and preventiv action“ (CAPA) Maßnahmen eingeführt um Schwachstellen im Herstellungsprozess zu erkennen und zukünftig zu eliminieren. Dazu gehörten:

- die Messung aller TKs am Laufzeitende mit Bactiflow für zwei Monate,
- die Prüfung, welche Mitarbeiter in der Herstellung der TKs beteiligt waren,
- die Prüfung, an welchen TSCD (Pooling-) Geräten die TKs hergestellt wurde,
- Abklatschproben in der Produktion,
- Untersuchung aller EKs und Plasmen,
- ein Internes Audit in Produktion und Probenziehung.

Eine Zusammenschau der Prüfungsergebnisse lässt den Schluss zu, dass von einer zufälligen Häufung dieser möglichen Komplikation einer TBBi ausgegangen werden kann. Die Ursache hierfür liegt am ehesten in der Kontamination durch physiologische Hautflora des Spenders.

Generell gelten Hautkeime als die häufigste Ursache bakterieller Kontamination von Blutprodukten.⁶²

Die fehlenden Informationen bezüglich Transfusionsindikation, Vorerkrankungen und Zustand des Patienten zum Zeitpunkt der Transfusion des kontaminierten TKs stellen jedoch eine Limitation in der Risikobewertung dar. Es stellt sich die Frage ob allein die Übertragung der Bakterien als ursächlich für die Verschlechterung des

Patientenzustandes anzusehen ist oder, ob eventuell Risikofaktoren, wie beispielsweise eine Immunerkrankung oder, wie bei Fall drei, eine schwere kardiopulmonale Erkrankungen, herausgearbeitet werden könnten und lediglich bei deren Vorliegen ein Bakterienschnelltest auch vor Tag 4 indiziert sein sollte.

Ebenfalls werfen die Auswertungen die Frage auf, ob in Zukunft TKs eventuell erst nach Erhalt der Testergebnisse des Bactiflow transfundiert werden sollten, sofern bereits eine Testung zwecks Laufzeitverlängerung angelaufen ist. Dies könnte Problematiken, wie es sie bei Zwischenfall 1 gab, umgehen. Allerdings steht demgegenüber das Problem, dass ein dringend benötigtes TK, welches richtlinienkonform transfundiert werden könnte, durch die Sperrung während des Bakterientests eventuell nicht zur Verfügung steht.

Ein Problem, welches generell Ursachenbewertungen und damit die Untersuchung von Kontaminationswegen und -vermeidungen erschwert, ist, dass nicht jede bakterielle Transfusionsreaktion mit der Transfusion als Ursprung in Verbindung gebracht wird. Eine Sensibilisierung des medizinischen Personals wäre hier eine Verbesserungsmaßnahme.⁹²

Die Untersuchung der Transfusionszwischenfälle wirft außerdem die Frage auf, ob eine generelle Testung auf bakterielle Kontamination von Thrombozytenkonzentraten ab Tag 0 angewandt werden sollte, wie per Kulturverfahren aktuell in den Niederlanden, Irland, Großbritannien, Dänemark und Portugal praktiziert⁵⁸, oder eine generelle Anwendung von Pathogeninaktivierungsverfahren sinnvoll wäre, um auch Zwischenfälle durch hohe Bakterienkontaminationen bis Tag 4 zu verhindern.

Dies erscheint zunächst sinnvoll, da die Wachstumskinetik beispielsweise von *Klebsiella pneumoniae* zeigt, dass Bakterienkontaminationen auch nach kurzer Zeit eine klinisch relevante Konzentration erreichen können. Die Limitation liegt jedoch darin, dass bei einer sofortigen Probenentnahme zu Testzwecken eventuell aufgrund der geringen anfänglichen Bakterienkonzentration keine Bakterien in der Probe nachgewiesen werden, sich jedoch im Beutel vermehren können. Die Gefahr des falsch negativen Ergebnisses wäre damit erhöht.⁵⁸ Bis zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden nach Spende

(aktuelles Modell) haben sich die Bakterien in der Regel jedoch bereits so stark vermehrt, dass dieser Probenfehler als unwahrscheinlich einzustufen ist. Daher werden Bakterientests in Deutschland aktuell auch erst nach frühestens 48 Stunden durchgeführt.

4.2 Bactiflow-, PCR- und BacT/ALERT-Mini-Pool-Tests

Wie die Ergebnisse der Transfusionszwischenfälle zeigen, sind bakterielle Kontaminationen von TKs ein relevantes Transfusionsrisiko.

Sowohl das Bactiflow- als auch das BacT/ALERT-Screeningverfahren haben sich nach der Bildung von 10er-Pools als geeignete Alternativen zur generischen 16s PCR-Methode erwiesen, die ebenfalls zuverlässig Bakterien in einem 10er-Mini-Pool nachweisen konnte.

Aktuell werden beim DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen bakterielle Screeningverfahren zur Laufzeitverlängerung frühestens 49 Stunden nach der Registrierung des Spenders zur Spende bei zu dem Zeitpunkt noch verfügbaren TKs angewandt. Dies betrifft allerdings nach der hausinternen Statistik nur 19,4% (111.592 von 575.091 Spenden). Anhand dieser Zahlen wird jedoch auch als eine Limitierung der Screeningmethoden deutlich, dass nicht alle Blutprodukte in das bakterielle Screening einbezogen werden können. Zum Teil liegt es daran, dass Kliniker vor allem ganz frische Thrombozyten benötigen und daher eine Latenzzeit von 48 Stunden nicht akzeptieren. Zum anderen werden auch Krankenhäuser beliefert, die ein eigenes Thrombozyten-depot unterhalten und nach der Auslieferung die Thrombozyten bis zum Ende der Haltbarkeit lagern. Diese Krankenhäuser erhalten in der Regel frische Thrombozyten, bei denen dann jedoch noch keine Untersuchung auf eine bakterielle Kontamination durchgeführt werden konnte. Vergleicht man den prozessualen Ablauf des Screenings mit dem der Pathogeninaktivierung, dann hätte eine generelle Pathogeninaktivierung den Vorteil, dass damit alle hergestellten Thrombozytenkonzentrate behandelt werden könnten.

Unabhängig von Entnahmezeitpunkt und getesteter Poolgrößen waren Bakterien in allen gespikten Produkten sowohl mittels Bactiflow, BacT/ALERT als auch PCR nachweisbar. Ein Nachweis für vergleichsweise kleine Bakterienmengen und Sporen, wie beispielsweise bei *B. cereus* erwiesen, war möglich. Jedoch zeigte sich hier bei der Bactiflow-Messung die geringste CFU-Zahl von 475, knapp über der Nachweisgrenze von 300 CFU. In der BacT/ALERT-Probe zeigte sich dagegen ein relativ schneller Nachweis für

alle *B. cereus*-Proben. Hier waren alle Nachweise in unter fünf Stunden möglich. Auch die PCR-Methode zeigte für bei *B. cereus* einen vergleichsweise schnellen Nachweis. Ein Anstieg der Bakterienkonzentration über die drei Messtage konnte bei der Bactiflow-Methode für fast alle Proben verzeichnet werden. Weiterhin waren hier bei allen Beuteln, die mit der gleichen Konzentration des gleichen Bakteriums bespielt wurden, ähnliche Bakterienkonzentrationen nachgewiesen.

Allerdings verzeichnete sich trotz des qualitativ einwandfreien Bakteriennachweises eine Abnahme der Counts einiger Bakterien antiproportional zur Zunahme der Poolgröße. Dieses Phänomen ist bereits von der PCR-Methode bekannt. Daher blieb die maximale Poolgröße bei zehn. Da die bisherige PCR-Methode, für die eine Pooltestung bereits validiert war und angewandt wurde, sollten als Alternative die Schnelltestmethode Bactiflow sowie die Goldstandardmethode BacT/ALERT ebenfalls für Poolproben validiert werden.

Vorteile der Poolbildung liegen zum einen in der Einsparung der Ressourcen Zeit und Kosten für Testmaterial, Probenlagerung und Personal. Hierbei überwiegt für den Empfänger der Vorteil der Zeiteinsparung. Können Proben schneller getestet werden, führt dies zum einen zur schnelleren Detektion bakterieller Kontamination und so eventuell zum noch rechtzeitigen Rückruf des TKs. Zum anderen müssen weniger TKs aufgrund von Zeitmangel verworfen werden und stehen somit länger zur Transfusion zur Verfügung. Nach einer Studie von Vollmer et. al. betrifft dies durchschnittlich ca. 20 % der Spenden, die nach Tag 4 noch vorhanden sind.² Bactiflow-Tests konnten bei durchschnittlich 4,54 % eine bakterielle Kontamination nachweisen.² Somit standen durch Bactiflow im Schnitt ca. 15,46 % aller TKs an Tag 5 noch für eine Transfusion zur Verfügung, statt verworfen worden zu sein. Als nachteilig zu werten ist nach Poolbildung allerdings die erschwerte Rückverfolgung zur Spende der Kontaminationsursache. Im Falle eines positiven Testergebnisses müssen wesentlich mehr Blutprodukte (TKs, EKs, Plasma, Granulozytenpräparate) zur Poolauflösung und Nachtestung vorübergehend gesperrt oder zurückgerufen werden als bei der Anwendung von Einzeltests.

Im ersten Quartal 2017 kam es aufgrund von Schwierigkeiten mit dem M1-Reagenz zu Problemen bei der Bactiflow-Screeningmethode, die unsichere Ergebnisse durch teilweise falsch positive oder falsch negative Tests erbrachten. Außerdem gab es Lieferschwierigkeiten für Material und Zubehör.

Die bisherige PCR-Methode als Ersatzmethode nicht gänzlich abzuschaffen macht daher Sinn. Vor allem, da die PCR-Geräte auch aufgrund anderer Einsätze, trotz einer geringen, nicht ergebnisrelevanten Zunahme der Detektionszeit proportional zur Größe der Pools, ein fester Bestandteil der Laborausstattung sind und ebenfalls zuverlässige Ergebnisse für 10er-Pools ergaben. Der Nachweis gelang trotzdem in der Regel noch schneller als bei der Kulturmethode BacT/ALERT.

Des Weiteren zeigt sich auch die Wichtigkeit der 10er-Pool-Tests mittels Kulturmethode des Goldstandards BacT/ALERT als alternative Testmethode. Für Pool-TKs ließ sich mit einer maximalen Detektionszeit von 11,28 Stunden ein sicherer Bakteriennachweis innerhalb von maximal 12 Stunden für die getesteten Bakterien beweisen, die für die Einzeltests durch Vollmer et. al bereits 2018 veröffentlicht wurden.⁹³

Die längste Zeit benötigte der Nachweis von *S. pyogenes*. Hier zeigte sich auch die insgesamt längste Detektionszeit von 11,28 Stunden bei einer anaeroben 10er-Pool-Probe an Tag 3. Die 10er-Pool-Proben von *S. pyogenes* waren die einzigen aller Proben, die eine Detektionszeit von 10 Stunden überschritten (viermal an Tag 4 aerob, einmal an Tag 3 anaerob und viermal an Tag 4 anaerob).

Für die bei der Untersuchung der Transfusionszwischenfälle untersuchten Keime verhielt sich die Detektionszeit bei BacT/ALERT insgesamt proportional zu den erstellten Wachstumskurven. *Klebsiella pneumoniae* konnte mit circa dreieinhalb Stunden beispielsweise schneller nachgewiesen werden als *Staphylococcus epidermidis* mit circa sechs Stunden.

Insgesamt dauert das eigentliche Bakteriencreening mit BacT/ALERT bis zum Bakterienausschluss also länger als die Fluoreszenzmethode mit Bactiflow oder mit der PCR-Methode, aerobe Proben waren durchschnittlich etwas schneller positiv als anaerobe. Auch, wenn ein Großteil der BacT/ALERT-Proben im Zeitraum zwischen drei bis fünf Stunden bereits positiv war, kann ein Bactiflow-Gerät in drei Stunden dank der

10er-Pool-Tests sicher 200 TKs testen. Die bisherige PCR-Methode dauert mit vier Stunden etwas länger, kann in dieser Zeit allerdings mit 90 10er-Pools und somit 900 TKs wesentlich mehr Spendenbeutel testen.

Durch die längere Testdauer und eine geringere Menge an Proben in gleicher Zeit ist bei der Nutzung der Kulturmethode das Risiko eines bereits transfundierten, kontaminierten Blutproduktes insgesamt höher als bei den übrigen Verfahren. Dies gilt besonders für Transfusionen an Tag zwei und drei, da hier auch ohne Nachweis eines negativen Bakterienscreenings transfundiert werden darf.⁹ Beim DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen werden aktuell TKs nach Möglichkeit nur nach vorheriger Testung rausgegeben. Allerdings geht die Versorgung vor, sodass es auch zur Transfusion noch nicht getesteter TKs kommt.

Als nachteilig gilt außerdem der größere Platzbedarf zur Probenlagerung im Vergleich zu Bactiflow oder PCR. Dies gilt besonders für die Blutkulturflaschen, auch wenn sich in einem Vergleich von Kacker et. al die Kulturmethode als kostengünstigstes Testverfahren auszeichnete.³⁸ Ein weiterer Vorteil ist eine teilweise höhere Sensitivität bei geringen Bakterienzahlen (< 150 Counts/ml) im Vergleich zur Bactiflow-Methode.⁹⁴

Zur Ressourcensparung wird beispielsweise in Dänemark ein Bakterientest per Kulturmethode nur mit aeroben Medien durchgeführt. In Finnland werden zur Qualitätskontrolle ebenfalls nur aerobe Medien beimpft.

Eine Relevanz von anaeroben Erregern für die Transfusion von TKs wird diskutiert. Häufig führen anaerobe Proben zu falsch positiven Ergebnissen.⁵⁸

Ebenso handelt es sich in vielen positiven Fällen um den Keim *C. agnes*, der nur in seltenen Fällen zu relevanten Komplikationen durch Bakteriämien führt.⁶⁰

Eine 2017 veröffentlichte Studie aus Großbritannien von Mc Donald et. al ergab in 66 % des Bakteriennachweises ein positives Ergebnis nur im aeroben Medium. Lediglich in 8 % war nur die anaerobe Kultur positiv.⁷²

Zu beachten ist allerdings, dass sowohl aerobe als auch anaerobe Proben aus dem Brutschrank genommen werden, sobald ein positives Ergebnis in einer von beiden verzeichnet wurde. Somit bleibt offen, ob die jeweils andere Probe kurze Zeit später (wie auch unter 3.2.1 gezeigt) ebenfalls ein positives Ergebnis gezeigt hätte.⁶⁰

Das Bactiflow-Verfahren macht hingegen keinen Unterschied zwischen aeroben und anaeroben Erregern, da es nur den bakteriellen Stoffwechsel nachweist.³

Im Vergleich zum vorher genutzten PCR-Verfahren ergab eine vom Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen durchgeführte Failure Mode and Effects Analysis (FMEA, Fehlermöglichkeits- und Einflussanalyse) keinen Anhalt für eine Risikoerhöhung der Bakterienübertragung durch TKs nach vorheriger Bakterientestung mittels Bactiflow-Pooltests.

Alle Bakteriencreening-Verfahren haben trotz der bereits erwähnten Vorgehensweise einer Testung frühestens nach 48 Stunden das Restrisiko, dass in der gezogenen Probe keine Bakterien enthalten sind, obwohl der Beutel positiv ist. In Deutschland ist mit der sogenannten 'late sampling' Methode diese Gefahr kleiner als beispielsweise in Großbritannien oder den Niederlanden. Hier ist ein 'early sampling' Verfahren mit einer Probenziehung nach 24 Stunden üblich, welches falsch negative Ergebnisse bei geringen Kontaminationskonzentrationen begünstigt.⁵⁸

Die ursprünglich durch den DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen genutzte PCR-Methode kann allerdings im Gegensatz zu Bact/ALERT und Bactiflow auch tote Bakterien nachweisen, da sie nicht abhängig vom bakteriellen Stoffwechsel ist.^{89, 95} Dies kann zu falsch positiven Ergebnissen führen. Durch das PCR-Screening kann es also im Vergleich häufiger zur Sperrung von eigentlich transfusionsfähigen TKs kommen.⁹⁶ Da jedoch auch abgestorbene Bakterien durch die vorhandenen Endotoxine eine klinische Relevanz haben können, wäre hier die PCR-Methode im Vorteil. Die klinische Relevanz von Endotoxinen ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Endotoxine sind Zellbestandteile von gram-negativen Bakterien. Sie bestehen aus Lipopolysacchariden (LPS) mit einem hydrophilen und einem lipophilen Anteil, die sich in der Zellmembran der Bakterien befinden.

Bei einer Infektion mit gram-negativen Bakterien sind es meist diese Endotoxine, die zur überschießenden Reaktion des menschlichen Immunsystems führen und stark pyrogen wirken. Dies kann bereits bei niedrigen Konzentrationen der Fall sein.⁹⁷

Werden die Bakterien abgetötet, zerfällt ihre Zellwand wodurch größere Mengen der LPS frei werden und so negative Auswirkungen auf das Immunsystem des Empfängers bis hin zum septischen Schock des Patienten nehmen können.⁴¹

Bactiflow benötigt zum Bakteriennachweis den bakteriellen Stoffwechsel zur Freisetzung eines DNA-Farbstoffes mittels Esterasen³, BacT/ALERT zum Anstieg der gemessenen Kohlenstoffdioxidkonzentration⁹⁸.

Ein positives Testergebnis ist also für den Patienten bei BacT/ALERT- und Bactiflow-Screenings wesentlich relevanter, da hier die hohe Wahrscheinlichkeit einer aktiven Infektion durch lebende Bakterien droht. Dies gilt auch unter der Prämisse, dass Bactiflow kein Sterilitätsnachweisverfahren ist, sondern sensitiv für eine als klinisch relevant anzunehmende Anzahl von Bakterien.⁹⁶

Geht man davon aus, dass bei einem negativen Testergebnis abgestorbene Bakterien in der Regel ohne zusätzlich vorhandene lebende, sich vermehrende Bakterien nur in geringen Mengen in einem TK vorhanden sind, ist die davon ausgehende Gefahr einer relevanten Immunreaktion wesentlich geringer.

Um das Problem falsch negativer Testergebnisse zu umgehen sowie um Ressourcen zu sparen, rückt die Möglichkeit der Pathogeninaktivierung aktuell stärker in den Fokus. Dieses Verfahren soll außerdem bewirken Ressourcen zu sparen, indem es die Anzahl transfundierbarer TKs erhöht. Dies kann einerseits durch die Möglichkeit der Transfusion initial positiv getesteter TKs nach erfolgreicher PI und der somit erreichten Erhöhung der transfundierbaren TK-Anzahl erfolgen. Andererseits könnte sich durch die Anwendung eventuell die Notwendigkeit einer bakteriellen Testung erübrigen. Pathogeninaktivierungsverfahren können entweder generell zur Vermeidung von Infektionsübertragung oder nach Erhalt eines positiven Bakterienscreenings angewandt werden.

Studien aus Belgien und Frankreich zeigen diesbezüglich jedoch keinen Unterschied der Anzahl an TK-Transfusionen vor und nach Implementierung des photochemischen Verfahrens `Intercept` als eines von drei aktuell möglichen PI-Verfahren.⁹⁹

Wurden, beispielsweise mittels Bactiflow, Pathogene im TK nachgewiesen, existieren zur Pathogeninaktivierung neben Intercept außerdem Mirasol als photodynamisches System und Theraflex als physikalisches System. Alle drei Methoden sind CE-zertifiziert und in der EU somit zugelassen.⁹⁶

Generell gilt, dass die PI im Gegensatz zum bakteriellen Schnelltest so früh wie möglich angewandt werden sollte, da sie für zu hohe Bakterienzahlen nicht mehr effektiv genug ist. Dies zeigte beispielsweise eine Studie von Schmidt et. al 2015 für das Interceptverfahren anhand mehrerer Bakterienstämme. Bei den Bakterien *K. pneumoniae* und *B. cereus* zeigten sich nach der Inaktivierung ein erneutes Bakterienwachstum, da nicht alle Bakterien durch das Intercept Verfahren inaktiviert wurden. Somit kommt die Studie zu dem Ergebnis, dass eine PI Methode möglichst unmittelbar nach der Spende durchzuführen ist. Hier besteht vor allem bei der Herstellung von Pool-TKs eine Herausforderung, da die Herstellung bis zu 35 Stunden nach der Blutspende benötigen kann.¹⁰⁰

Nach der jeweiligen Anwendung der PI können die Blutprodukte laut Hersteller weiterhin wie gewöhnlich für eine Transfusion verwendet werden. Eine Studie mit direktem Vergleich der drei Methoden existiert derzeit nicht.¹⁰¹ Allerdings vergleichen einige Reviews die Verfahren durch Vergleiche diverser Einzelstudien. Die 2018 veröffentlichte Stellungnahme des RKI zu „Pathogen-Inaktivierungssystemen von Thrombozytenkonzentraten“ stellt die jeweiligen Vor- und Nachteile gegenüber. Des Weiteren spricht das RKI sich darin für eine weiterführende Forschung zum Einsatz von PI-Systemen aus, um ein sicheres Eliminationsverfahren für eventuell neue, durch Screeningsysteme noch nicht detektierbare Erreger vorhalten zu können.⁹⁶

Das Intercept-Verfahren wird von der Firma Cereus Europe BV vertrieben und findet im geschlossenen System statt. Bei diesem Verfahren wird das synthetische Psoralenderivat Amotosalen HCl (S-59) zum Blutprodukt hinzugegeben. Möglich ist das Verfahren bei Blutplasma oder Thrombozytenkonzentraten. Anschließend wird das Blutprodukt mit UV-A-Strahlung (320 – 400 nm) vier bis sechs Minuten bestrahlt, wodurch es zu einer photochemischen Reaktion kommt, welche dazu führt, dass das Amotosalen kovalent an die Pyrimidinbasen von DNA oder RNA der im Blutprodukt befindlichen Pathogene

bindet. Hierdurch verlieren Bakterien, Viren und Parasiten weitestgehend ihre Teilungsfähigkeit. Im Anschluss sorgt eine Absorptionsvorrichtung dafür, dass Amotosalen und seine Photoprodukte aus dem Blutprodukt entfernt werden, wobei allerdings geringe Rückstände zurückbleiben.¹⁰²

Der Vorteil des Verfahrens ist, dass es durch die Inaktivierung der im Blutprodukt vorhandenen Restleukozyten neben der Verminderung der Rate der Infektionsübertragung auch das Risiko einer Graft-versus-host-Reaktion minimiert. Die Notwendigkeit der γ -Bestrahlung entfällt dadurch.^{96, 103, 104}

Einen Nachteil stellen die in der Spende zurückbleibenden Photoprodukte dar, die, wie alle Fremdstoffe theoretisch eine Immunreaktion beim Empfänger auslösen können.¹⁰⁵

Eine 2015 veröffentlichte prospektive Studie von Knutson et. al im Vox Sanguinis Journal zeigte hierzu zwar keinen signifikanten Anstieg an unerwünschten Transfusionsreaktionen nach dem Einsatz des Intercept-Verfahrens.¹⁰⁶

Allerdings senkt diese PI-Methode signifikant den pH des TK, was jedoch keine Relevanz für dessen Qualität oder Effektivität hat.¹⁰⁷

Weiterhin hat eine bereits 2012 veröffentlichte norwegische Studie signifikant niedrigere LPS-induzierte TNF- α - Sekretion in Aphaese-TKs nachgewiesen, die mit Intercept behandelt worden waren. Untersucht wurde hier, ob die Anwendung von Intercept bei TKs das Risiko für eine TRALI erhöht. Neben der signifikant niedrigeren Aktivierung von TNF- α , konnte kein Unterschied zur Konzentration von sCD 154 und der neutrophilen (PMN)-Priming-Aktivität durch Intercept nachgewiesen werden. Dies ließ den Schluss zu, dass Intercept das TRALI-Risiko nicht negativ beeinflusst.¹⁰⁷

In der Richtlinie Hämotherapie Gesamtnovelle 2017 der BÄK ist die Pathogeninaktivierung mittels Amotosalen/UVA, sprich Intercept, als einziges Verfahren offiziell genannt.¹⁰⁸

Nach dieser Inaktivierung dürften TKs weiter wie gewöhnlich transfundiert werden.

Eine Studie in Frankreich zeigte 2011, dass eine Implementierung des Intercept-Systems in die Routine für die Gesamtabläufe des Blutspendedienstes keine großen Konsequenzen hätte.¹⁰⁹

Das MIRASOL-System wird von der Firma Caridian-BCT Biotechnologies/Terumo Corp. vertrieben. Es handelt sich um ein photodynamisches Verfahren, welches mit Hilfe der Zugabe des Photosensitizers Riboflavin zum Blutprodukt (Plasma oder Thrombozytenkonzentrate) und der über wenige Minuten gehenden Bestrahlung mit UV-A- sowie UV-B-Strahlen Nukleinsäuren von Pathogenen durch Photooxidation schädigt.

Eine Absorption des vorher zugegebenen Riboflavin ist nicht erforderlich, da es sich um ein natürlicherweise im menschlichen Körper vorkommendes Vitamin A handelt.^{103, 110}

Durch Mirasol behandelte Thrombozyten zeigen eine verringerte Thrombozytenaggregation unter den Bedingungen hoher Scherkräfte.¹¹¹

Außerdem führt es zu einer Erhöhung von Parametern reaktiven oxidativen Stresses (ROS) wie NF-κB. Unklar ist, ob die Erhöhung auf der Aktivierung von Thrombozyten durch Mirasol beruht oder Mirasol diese Erhöhung direkt bedingt, die dann wiederum zu einer Aktivierung der Thrombozyten führt.¹¹²

Negative Effekte auf die Qualität der Thrombozyten und ihrer Funktion steigen bei intensiverer Anwendung von Mirasol (> 6,2 J/ml).¹¹³

Das Verfahren kann ebenfalls die im TK verbliebenen Leukozyten effektiv inaktivieren und somit die Leukozytendepletion ersetzen.¹¹⁴ Allerdings kann es theoretisch auch hier durch eingebrachte Fremdstoffe zu Immunreaktionen beim Empfänger kommen. Da es sich wie oben bereits erwähnt allerdings um einen Stoff handelt, der im Körper selbst vorkommt, scheint die Gefahr bei MIRASOL geringer, als beim Intercept-Verfahren.

Bakkour et al. testeten 2014 eine PCR-Methode zur Messung der Effektivität von Mirasol bei TKs mittels Messung von mtDNA erfolgreich.¹¹⁵

Das Theraflex-Verfahren, welches von der DRK Forschungsgemeinschaft sowie der Firma Macopharma entwickelt wurde, ist das neueste der drei gängigen Pathogeninaktivierungsverfahren und befindet sich gegenwärtig im Zulassungsverfahren bei der Bundesoberbehörde. Das Verfahren kann ebenfalls bei Plasmaspenden und Thrombozytenkonzentraten angewandt werden.

Die Produkte werden mit einem UV-C-Licht von 254nm etwas weniger als eine Minute bestrahlt und während des kompletten Prozesses durchgeschüttelt, um eine

vollständige Erreichbarkeit der Pathogene durch die Strahlen im ganzen Beutel zu erreichen. Eine 2016 veröffentlichte Studie von van der Meer et al. ergab eine bessere Effektivität in der bakteriellen Inaktivierung bei höheren Geschwindigkeiten von 180 statt 110 rpm.¹¹⁶

Generell zeigten sich in dieser Studie außerdem in vitro niedrigere Glucose- und höhere Laktatwerte in Theraflex-behandelten TKs im Vergleich zu nicht behandelten, was für einen erhöhten Metabolismus durch Theraflex spricht.¹¹⁶

Photoaktive Zusatzsubstanzen sind nicht von Nöten. Damit ist dieses Verfahren von allen dreien am schnellsten durchführbar. Außerdem wird der Empfängerorganismus hier nicht durch eingebrachte Reste von Zusatzsubstanzen belastet. Die UV-C-Strahlung sorgt für eine kovalente Vernetzung von Nukleotiden in Nukleinsäuren, wodurch kernhaltige Zellen ihre Replikationsfähigkeit verlieren. Bakterien, Viren, Protozoen und Leukozyten werden dadurch inaktiviert. Somit ersetzt auch dieses Verfahren die Leukozytendepletion.

Im Jahr 2017 berichteten Kim et al. über eine in Zusammenarbeit mit den DRK-Blutspendediensten in Deutschland neu entwickelte PCR-Methode zum Nachweis Theraflex-bedingter mitochondrialer DNA-Schäden. Ziel war es, das Theraflex-Verfahren zu optimieren.¹¹⁷

Ein großer Vorteil der Pathogeninaktivierung ist, dass ein Großteil aller Pathogene inaktiviert wird, nicht ausschließlich Bakterien.

Somit können auch Pathogene erfasst werden, die eventuell von Screeningmethoden nicht detektiert worden sind, beziehungsweise nicht detektiert werden können. Jedoch werden einige Pathogene eventuell von PI-Methoden nicht erfasst, sodass eine alleinige Anwendung von PI eine falsche Sicherheit vortäuschen könnte. So sind alle drei Systeme beispielsweise nicht effektiv in der Inaktivierung von nicht aktiven Sporen sowie sehr hohen Bakterienkonzentrationen und erfassen keine Prionen.^{76, 96, 100, 105, 76}

Im Jahr 2011 wurde diesbezüglich bereits durch die medizinische Akademie des serbischen Militärs die Effizienz und Patientensicherheit von Mirasol getestet. Eine sichere Pathogeninaktivierung zeigte sich dort nur bis zu einer Anzahl von 10^3 CFU pro TK.¹¹⁸

In einem Review zur Frage der biologischen und klinischen Auswirkungen von Pathogeninaktivierungsmethoden wurde 2013 die Pathogeninaktivierungseffektivität in einem Review zu allen drei Methoden verglichen. Es zeigten sich geringfügige Unterschiede der einzelnen Verfahren bezüglich verschiedener Erreger.^{99, 119} Allerdings ist hierbei kein Vergleich bezüglich Sporenbildnern gezogen. Eine Studie von Schmidt et. al zeigte für diese Bakterienspezies beispielsweise noch einmal Schwächen des Interceptsystems.¹⁰⁰ Diese werden auch in der Fachinformation der Firma Cereus angesprochen.¹⁰⁵

Ein weiteres Problem ist, dass neben einer zu hohen anfänglichen Bakterienkonzentration auch ein zu später Durchführungszeitpunkt zur Ineffektivität der Pathogeninaktivierung führen kann. Bei Proben, die nach mehr als 35,5 Stunden durch Intercept behandelt wurden zeigte sich beispielsweise häufig ein positives Ergebnis des anschließend durchgeführten Bakterien Schnelltest. Es wird davon ausgegangen, dass dies an der hohen Kolonienzahl liegt, da die Bakterien mehr Zeit zur Vermehrung hatten und ab einer gewissen Konzentration die Effektivität des Verfahrens abnimmt.¹⁰⁰ Jedoch ist auch ein nach der Aktivierung erneut auftretendes Wachstum nicht gänzlich ausgeschlossen.

Bezüglich des diskutierten erhöhten Risikos für Immunreaktionen bei PI wurde 2018 eine randomisierte Studie amerikanischer und italienischer Forschungslabore veröffentlicht, nach der es, wie bereits 2015 durch eine Studie von Knutson et. al gezeigt, ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Autoimmunreaktionen zwischen Mirasol- oder Intercept-behandelten TKs im Vergleich zu unbehandelten TKs beim Empfänger kam.^{107, 120}

Dem entgegen zeigte sich in mehreren Studien ein deutlicher Nachteil durch einen geringeren Anstieg der Thrombozytenzahl im Blut im Vergleich zu unbehandelten Thrombozyten. In Belgien wurde beispielsweise nach Einführung einer generellen Pathogeninaktivierung im Jahr 2009 aufgrund Beeinträchtigungen der Effektivität die Haltbarkeit von TKs von 7 auf 5 Tage reduziert.⁵⁸

Ein 2017 veröffentlichtes Review in der Cochranche Datenbank ergab außerdem ein erhöhtes Risiko für refraktäre Thrombozytopenien nach der Transfusion Pathogeninaktivierter TKs bei onkologischen Patienten.¹⁰¹

Zu beachten ist auch, dass unterschiedliche Lagerungsmedien divergente Ergebnisse erzielen und die Studien somit nicht direkt miteinander vergleichbar sind.⁹⁹

Fraglich ist auch, ob eventuell die Anzahl der Endotoxine nach der Pathogeninaktivierung ansteigt. Begleitend zu hiesiger Studie wurde versucht, diese per Endosafe-PTS nachzuweisen. Dieses Gerät zeigte sich jedoch als nicht geeignet für die Bestimmung der Endotoxinanzahl, sondern konnte lediglich das Vorhandensein von einer Mindestmenge an Endotoxinen nachweisen.

Ein genereller Anstieg unerwünschter Transfusionsreaktionen ergab sich trotz dieser Problematiken in zwei randomisiert kontrollierten italienischen Studien von Rebulli et al. nicht.¹²¹

Allerdings sind durch Zusatzstoffe bedingte allergische Reaktionen besonders bei Intercept möglich. Auch die durch den Zellzerfall anfallenden Endotoxine können, wie bereits oben genannt, zu Reaktionen des Immunsystems führen.

Ebenso ist zu bedenken, dass PI aufgrund seiner Wirkung auf Nukleinsäuren allesamt unwirksam gegen Prionen ist.⁹⁶

Als nachteilig ist auch zu beachten, dass die Pathogene durch PI zwar ihre Teilungsfähigkeit verlieren, jedoch weiterhin im Blutprodukt vorhanden sind.

Fraglich ist, ob die nach Pathogeninaktivierung immer noch vorhandenen Endotoxine pyrogene Reaktionen nach Transfusion auslösen können. Es liegt außerdem nahe, dass sich durch die Inaktivierung und den damit einhergehenden möglichen Zerfall von Bakterien, die Endotoxinanzahl eventuell sogar erhöht. Seit Jahren wird vermutet, dass dies beispielsweise auch bei dem durch Antibiotikatherapie von bakteriellen Infektionen bedingten Bakterienzerfall starke Immunreaktionen bis zur Sepsis auslösen kann.⁷⁶

Problematisch ist außerdem eine Biofilmbildung im TK-Beutel, die durch die gängigen Pathogeninaktivierungssysteme in der Regel schwierig zu erreichen und zusätzlich die bakterielle Kontamination oft durch Kulturmedien nicht nachweisbar ist.^{122, 123}

Eine späte Anwendung der PI begünstigt dieses Risiko.¹²²

Allerdings bietet die Anwendung eines Pathogeninaktivierungsverfahrens, im Gegensatz zum reinen Bakteriencreening, den Vorteil der gleichzeitigen Deaktivierung von Lymphozyten und damit einhergehend die Vorbeugung einer GvHD und eventuell auch eine verminderte Immunreaktion auf LPS.

Ein weiteres vergleichendes 2018 veröffentlichtes Review deckte weitere Vorteile auf.

Es kam zu dem Schluss, eine generelle Revolution der Behandlung von TKs in der Zeit zwischen Spende und Transfusion hin zur gekühlten beziehungsweise kryokonservierten Lagerung in Kombination mit der Behandlung durch PI-Methoden könnte sowohl die Verfügbarkeit als auch die Transfusionsicherheit verbessern.⁷⁶

Dass es durch Kühlung nicht zu einer Reduktion der Bakterienkolonien kommt, konnte mit Hilfe der Transportvalidierung der hiesigen Arbeit gezeigt werden.

4.3 Transportvalidierung

Die Ergebnisse der Transportvalidierung zeigen, dass der Probentransport von anderen Standorten der DRK-Blutspendedienste in Deutschland zu den Bakterientest-Instituten Frankfurt, Plauen und Ulm keine falsch negativen Ergebnisse zur Folge hat. Dies gilt für eine Transporttemperatur zwischen 4°C bis 24°C. In den 10er-Pool-Tests fielen bei der Bactiflow-Methode zwar quantitative Counts ab, jedoch fiel das qualitative Ergebnis nie unter einen als negativ ausgewiesenen Bereich von 300 Counts. Die BacT/Alert-Messungen waren ebenfalls alle korrekt positiv. Bei der inhouse-PCR waren besonders bei den Poolproben, bis auf *B. cereus*, minimal höhere CT-Werte nach einer Lagerung bei 4°C zu verzeichnen als bei Raumtemperatur. Dies hatte jedoch keine Relevanz für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Daher spricht aus Sicht der Screeningsicherheit nichts gegen eine Zentralisierung des Bakterien Screenings mittels Bactiflow, PCR und/oder BacT/ALERT. Überraschend waren diese Ergebnisse dahingehend, dass die ersten beiden Messmethoden auf die Stoffwechselaktivität lebender Bakterien angewiesen sind, das Herunterfahren des Bakterienstoffwechsels bei Kälte jedoch keine falsch negativen Ergebnisse verursachte. Dies spricht für eine sehr gute Sensitivität beider Verfahren. Solange die Proben in einem Transportmedium transportiert wird, welches eine Temperatur im getesteten Bereich von 4°C bis 24°C garantieren kann, ist eine Temperaturüberwachung während des Transportes daher als überflüssig zu betrachten.

In Anbetracht der Tatsache, dass Ketter et. al Anfang 2019 eine Studie zum Bakterienverhalten in gekühlten TKs veröffentlichten, in der die Funktionsfähigkeit der TKs nicht relevant beeinträchtigt war, ein steiler Anstieg der Bakterienkurven jedoch ausblieb, ist die Validierung der Schnelltestmethoden auch für gekühlte TKs aktuell sehr relevant. Ein weiterer Vorteil der Kühlung ist nach Ketter et. al außerdem eine geringe Laktat- und Glucosekonzentration im TK.¹²⁴ Hinzu kommt ein geringerer Anstieg von Zytokinen sowie weiteren immunaktivierenden Proteinen.¹²⁵

Ein zusätzlicher Vorteil wäre außerdem eine gemeinsame Lagerungsmöglichkeit von TKs und EK und somit eine Einsparung der Ressource Platz.¹²²

In den 70er-Jahren wurde die gekühlte Lagerung der Thrombozyten bereits erfolgreich angewandt. Aufgrund der Tatsache, dass „die Lebensdauer der Thrombozyten [hierbei

allerdings] auf zwei bis vier Tage im Blutkreislauf beschränkt war, wurde sie [schließlich] durch die Lagerung in Agitation bei $+22 \pm 2$ °C ersetzt“.¹²⁶ Dem Gegenüber steht heute die Erkenntnis, dass TKs nach gekühlter Lagerung im Empfängerorganismus besser aktiviert werden können. Der Grund dafür ist noch unklar. Allerdings wurden bereits einige Lösungsansätze, wie beispielsweise eine veränderte Anordnung der Zellorganellen, die eine größere Zelloberfläche und damit eine bessere Ligandenbindungsfähigkeit zur Folge hat, bereits gefunden. Dadurch sollen gekühlte TKs besonders vorteilhaft beim Einsatz im Falle von akuten Blutungen sein.¹²⁶

Nachteilig ist aktuell die fragliche Kombinationsmöglichkeit von gekühlter Lagerung der TKs und Pathogeninaktivierung.

Erste Studien diesbezüglich zeigten bei gekühlter Lagerung nach erfolgter Pathogeninaktivierung beispielsweise per UVC (Theraflex) vermehrte Veränderungen im thrombozytären Stoffwechsel sowie einen erhöhten mitochondrialen Schaden.¹²⁷

Weitere Nachteile sind aktuell das Fehlen von Evidenz und Richtlinien für diese Lagerungsart.¹²⁶

Ein weiterer aktueller Forschungsansatz gilt der Reaktivierung einer kryokonservierten Lagerung, welche ebenfalls bereits in den 70er Jahren kurzzeitig angewandt wurde. Dabei wird das TK mit einem Schutzmittel bei -80 °C gelagert und ist nach dem Auftauen sechs Stunden haltbar. Die maximale Lagerungsdauer bei dieser Methode beträgt zwei Jahre. Seit 2001 wird diese Methode beispielsweise wieder erfolgreich durch das niederländische Militär genutzt. Vorteil der Methode ist ebenfalls eine gute Wirksamkeit der TKs bei Patienten mit akuten Blutungen. Bei dieser Lagerungsmethode wird diese Fähigkeit allerdings auf die höhere Anzahl an Mikropartikeln zurückgeführt und hat den Vorteil, dass bei der Durchführung einer Massentransfusion weniger TKs anteilig notwendig sind.¹²⁶

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sowohl Bactiflow, als auch BacT/ALERT und die bisherige aufgrund von Schwierigkeiten mit dem M1-Reagenz genutzte PCR-Methode als Standardmethode zum Bakterienscreening nach Poolbildung von bis zu zehn Spendenbeuteln von Pool- oder Apherese-TKs geeignet sind. Die Vorteile von Bactiflow liegen in der kürzeren Zeit bis zum Ergebniserhalt sowie in der geringeren Lagerplatzbeanspruchung. Nachteilig sind vor allem zwischenzeitliche Testungenauigkeiten im Routinebetrieb, erschwerter Nachweis von inaktiven Sporen sowie Lieferschwierigkeiten für Zubehör. Die PCR-Methode hat den Vorteil, auch tote Bakterien oder inaktive Sporen nachweisen zu können. Ersteres kann jedoch zur Erhöhung des Verwurfes von TKs führen durch eine erhöhte Anzahl irrelevant positiver Ergebnisse.

Auf dem Vormarsch befinden sich außerdem Pathogeninaktivierungsverfahren, die eine weitere Nutzung positiv getesteter TKs ermöglichen und Bakterientests generell ersetzen können.⁹⁶ Dies geschieht aktuell zum Preis von geringen Qualitätseinbußen der Thrombozytenfunktionsfähigkeit sowie dem geringen Risiko der allergischen Reaktion auf Inhaltsstoffe (abgesehen von Theraflex) beziehungsweise der frei gewordenen LPS.^{58, 101} Ein klarer Vorteil liegt in der Ressourcenoptimierung sowie der zusätzlichen Inaktivierung anderer Pathogene zusätzlich zu Bakterien.

Zusätzlich zu allen drei oben dargelegten Studienbestandteilen sollte der Gesundheitszustand des Empfängers zum Zeitpunkt der Spende als etwaiges Risiko für eine Transfusionskomplikation nicht gänzlich außer Acht gelassen werden, was auch die Untersuchung der Transfusionszwischenfälle zeigt.

Mit diesem Thema sowie mit der Optimierung des Transfusionszeitpunktes, besonders von Erythrozytenkonzentraten, beschäftigt sich derzeit unter anderem die Initiative „Patient Blood Management“ (PBM).

Hierzu wurden außerdem sogenannte Transfusionstrigger für Erythrozytenkonzentrate nach den `Querschnittsleitlinien der Bundesärztekammer zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten 4. überarbeitete und aktualisierte Auflage 2014`

und Risikofaktoren wie Koronare Herzkrankheit (KHK), Herzinsuffizienz oder cerebrale Ischämie ausgearbeitet und stetig weiter überprüft.^{9, 128} Diese sollen behandelnden Ärzten als Richtschnur dienen, um die Versorgung ihrer Patienten individuell zu optimieren. Zielgruppen sind vor allem präoperative Diagnostik, wozu auch ein Achten auf eine möglichst geringe Füllmenge von Blutröhrchen gehört und intraoperative Maßnahmen zur Minimierung des Blutungsrisikos durch die Fachbereiche Anästhesie und Chirurgie.¹²⁹

Besonders bei elektiven Eingriffen soll hiernach eine rechtzeitige Diagnostik stattfinden. Weiterhin soll die Transfusion von Fremdblut, auch je nach patienteneigenen Risikofaktoren, zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt erfolgen. Diese Punkte sind in der neuen AWMF-Leitlinie „präoperative Anämie“ 2018 zu finden¹³⁰, welche dabei helfen soll, die knappe Ressource Blut sinnvoll einzusetzen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der für die Transfusion jeglicher Blutprodukte von Bedeutung ist, ist der Immunstatus des Empfängers. Zur Gruppe der gefährdeten Personen gehören vor allem Immunsupprimierte, Polytransfundierte und Patienten mit Zustand nach einer nicht geklärten hämolytischen Transfusionsreaktion. Hinzu kommen Kinder, vor allem Neugeborene, sowie Mädchen und gebärfähige Frauen.

Bei diesem Personenkreis sollten die Blutkomponenten nach dem jeweiligen Risiko vor der Transfusion besonderen vorherigen Maßnahmen unterzogen werden. Hierzu gehört beispielsweise die Bestrahlung zur Leukozytendepletion, die Waschung der Erythrozytenkonzentrate, Kryokonservierung oder eine zusätzliche diagnostische Qualifizierung auf (Humanes) Cytomegalievirus (HCMV oder CMV) und Parvovirus-B19.⁹ Der Konsens zur Transfusion von Thrombozyten ist aktuell, von einer prophylaktischen Gabe abzusehen und die Transfusion nicht nur anhand des absoluten Thrombozytenwertes im Blut vorzunehmen, sondern diesen Wert in Kombination mit dem jeweiligen individuellen Blutungsrisiko durch das jeweilige Erkrankungsmuster zur Grundlage zu kombinieren.^{9, 130}

Die Kombination aus dem wohl überlegten Einsatz von Transfusionen, einer gewissenhaft durchgeführten Hautdesinfektion beim Spender, steriler Verarbeitung der

Spende sowie Durchführung von möglichst schnellen Bakterientests als auch der mögliche Einsatz von PI stellen die aktuell größtmögliche Sicherheit zur Vermeidung von Infektionen durch TKs in Deutschland dar.

4.4 Routineanwendung

Seit 2016 wird das in dieser Promotionsarbeit entwickelte Bactiflow-Verfahren in der Routine im Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen und dem Blutspendedienst Nord-Ost in der täglichen Routine eingesetzt. In der Beobachtungszeit der letzten vier Jahre wurden insgesamt 575.091 Thrombozytenkonzentrate hergestellt, von denen 111.592 mit dem Bactiflow-Verfahren untersucht wurden. Der Nachweis von zwölf Keimen in den getesteten Thrombozytenkonzentraten hat somit nachweislich mit dazu beigetragen, die Sicherheit der Thrombozytenkonzentrate zu erhöhen und bakterielle Übertragungen zu vermeiden. Durch die Routinedaten wird die Bedeutung der experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit gesteigert, da damit die klinische Relevanz belegt wird. Die Anwendung der bakteriellen Schnelltestmethode hat somit mit dazu beigetragen, dass in zwölf Fällen eine bakterielle Übertragung durch die Transfusion von kontaminierten Thrombozytenkonzentraten vermieden wurde.

5 AUSBLICK

Um in Zukunft das Risiko zur Übertragung von Problemkeimen mit speziellen Lebensräumen, wie beispielsweise *Streptococcus dysgalacticae* oder Multiresistente Erreger, zu detektieren und somit zu minimieren, wäre eine Überarbeitung des Spenderfragebogens denkbar. Der bisherige vorübergehende Spendenausschluss von Spendern nach medizinischer Intervention mit erhöhtem Bakteriämierisiko wie Zahneingriffe oder Endoskopien ist bereits ein wichtiger Schritt zur Risikoreduzierung der bakteriellen Kontamination der Spende. Zusätzlich könnte beispielsweise im Spenderfragebogen eine Abfrage zum Umgang mit Tieren oder Menschen, die an Multiresistenten Erregern erkrankt sind, hinzugefügt werden. Gerade letzteres könnte in Zukunft durch die Zunahme und Ausbreitung dieser Erreger relevant werden. Um die Brisanz dieser Überlegung beurteilen zu können, wäre beispielsweise das Anstreben einer Studie bezüglich der Häufigkeit multiresistenter Keime, in aufgrund von Bakteriennachweis gesperrten TKs, sinnvoll.

Ein begünstigender Faktor für das Vorliegen asymptomatischer Bakteriämie kann, als Ergänzung zu den bisher im Spenderfragebogen abgefragten Risiken, außerdem eine häufig vorkommende Parodontitis in Kombination mit einer kürzlich zurückliegenden zahnärztlichen Behandlung sein. Jedoch ist auch ein lang zurückliegender Zahnarztbesuch und dadurch häufig vorliegender schlechter Zahnstatus ebenso risikobehaftet.¹³¹

Abgefragt wird aktuell nur ein kürzlich zurück liegender zahnärztlicher Eingriff. Zu überlegen wäre, eine kurze Mundraumkontrolle eventuell in die ärztliche Untersuchung vor der Spende zu integrieren. Auch hierzu könnten Studien eventuell zeigen, ob dies das Auftreten von positiven Bakterienschnelltests bei TKs reduziert.

Zusätzlich zu den Vorsichtsmaßnahmen vor und während der Spende ist es wichtig, die Bakterienschnelltestmethoden zu vereinfachen und ressourcenschonend zu gestalten. Dies ist beispielsweise durch die vorliegende Arbeit mittels Validierung der 10er-Pool-Tests von Bactiflow, Bact/ALERT als mögliche Alternative zur realtime-PCR bereits ein Stück weit geschehen.

Ein genereller Einsatz der zuverlässigen Goldstandardmethode Bact/ALERT als Bakterienschnelltestverfahren ist aufgrund der Lieferschwierigkeiten für Material und des hohen Platzbedarfs und Materialeinsatzes zu überlegen.

Die Wichtigkeit der Forschung gilt ebenso für die Anwendung von Pathogeninaktivierungsverfahren. Bezüglich ihrer aktuellen Anwendung gilt es, eine Kosten-Nutzen-Abwägung vorzunehmen. Hierbei sollte die mögliche Qualitätsminderung der Thrombozyten beispielsweise durch das Intercept-Verfahren und die damit, laut einem 2013 veröffentlichten Review, verbundene signifikant verminderte CCI nach 24 Stunden ohne signifikante Verringerung der Homöostasefähigkeit oder erhöhtes Blutungsrisiko einer verminderten Wahrscheinlichkeit der Infektionsübertragung gegenübergestellt werden.⁴⁶

In der Schweiz, Belgien und Frankreich konnte die generelle Einführung der Pathogeninaktivierung bakterielle Transfusionszwischenfälle komplett eliminieren.^{92, 96} Allerdings wurde beispielsweise in der Schweiz und in Belgien aufgrund von Qualitätseinbußen der thrombozytären Hämovigilanz eine Reduktion der Haltbarkeit von TKs von 7 auf 5 Tage vorgenommen.⁵⁸ Zu achten ist bei diesen Methoden, im Gegensatz zu bakteriellen Schnelltestverfahren, auf einen besonders frühen Einsatz, da sonst die Gefahr besteht, dass die bakterielle Kontamination die maximale Inaktivierungskapazität übersteigt.^{96, 100, 132}

Ein Routineeinsatz von PI ist in Deutschland in Zukunft ebenfalls denkbar. Für den DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen liegt eine Zulassung für die Nutzung von Intercept bereits vor.

Es existieren außerdem bereits Ansätze, Pathogeninaktivierung auch für Plasma- oder Erythrozytenkonzentrate oder gar Vollblut anzuwenden. Eine Anwendung für Erythrozyten war eines Reviews aus 2014 zufolge mittels Intercept erfolgreich. Allerdings litt dadurch die Homöostase der Erythrozyten dadurch, sodass im Falle einer Anwendung eine Reduktion der Haltbarkeit zu überlegen ist.¹³³

Die generelle Anwendung der Pathogeninaktivierung in der Transfusionsmedizin könnte in Zukunft auch bei der Verbreitung endemischer Krankheiten helfen. In Ghana konnte

die Anwendung von Mirasol bei Erythrozytenkonzentraten beispielsweise in einer Studie bereits die Übertragungsrate von Malaria senken.¹³³

Derzeit werden in Europa außerdem weitere mögliche Verfahren für bakterielle Schnelltestverfahren getestet. In Frankreich zeigte beispielsweise 2017 eine Kombination aus matrixgestützten Laserverfahren und Massenspektrographie einen zuverlässigen Bakteriennachweis.¹³⁴

Im Jahr 2018 eröffneten Vossier et. al außerdem eine französische Studie zu einem neuen Nachweisverfahren per Immunassay. Eine Testung ist danach an Tag 2 sensitiv für 1 bis 10 CFU/ml gram-negativer und 1 bis 100 CFU/ml gram-positiver Bakterien.¹³⁵

Es wird sich zeigen, ob diese Methoden routinetaugliche Alternativen für die Zukunft darstellen.

Ein weiterer, momentan durch Forschungen verfolgter, Ansatz ist die Kühlung von TKs und somit die Verschlechterung der bakteriellen Wachstumsbedingungen sowie die Verbesserung der thrombozytären Funktion trotz längerer Lagerung.

Bisher war in Deutschland neben dem bakteriellen Risiko der Qualitätsverlust der Thrombozyten bei Lagerungen über fünf Tagen eine weitere Begründung zur Begrenzung der Haltbarkeit. Dieses Argument könnte unter gekühlten Lagerungsbedingungen neu überdacht werden.¹²⁶

Die obigen Ergebnisse der Transportvalidierung zeigen zwar keinen relevanten Abfall der Bakterienkonzentration bei einem Transport bei 4° C, eine Einführung der gekühlten Lagerung als zusätzliche Maßnahme zur Vermeidung einer TBBI ist dennoch zu überlegen, da sie einige unter 4.3 erläuterten Vorteile bietet. Auch eine erneute Einführung der kryokonservierten Lagerung könnte in Zukunft einige Vorteile wie Erhöhung der Verfügbarkeiten, sowie erfolgreichen und produktsparenden Einsatz von TKs.¹²⁶

Ein abschließendes Urteil zu Pros und Contras der gekühlten Lagerung von TKs ist somit derzeit nicht möglich.

Ein ebenfalls wichtiges Forschungsthema ist die Möglichkeit zur Verlängerung der TK-Haltbarkeit zur Sicherung der generellen Produktverfügbarkeit.

Ein 2018 veröffentlichtes Literatur-Review von Aubron et. al zeigt, dass in nur einer von fünf Studien ein Anstieg des Sepsisrisikos bei der Transfusion älterer TKs verzeichnet wurde.¹³⁶

Eine Verlängerung der Haltbarkeit bis zu Tag 7 ist aktuell beispielsweise in den USA, Großbritannien, Australien und Canada bereits gängige Praxis.⁹³

In den USA war bis September 2019 durch die FDA die Anwendung eines Kulturverfahrens zur Bakterientestung oder eine Behandlung der TKs mit einem Pathogeninaktivierungsverfahren vor der Transfusion vorgeschrieben.¹³⁷

Wurde das TK an Tag 5, 6 oder 7 noch einmal mit einem Kulturverfahren auf bakterielle Kontamination getestet, war eine Transfusion noch möglich. Seitdem dies eingeführt wurde, sind 3% weniger Verwurf und 12 % weniger dringende Nachbestellungen aufgrund aufgebrauchter Lager durch das jeweilige Krankenhaus verzeichnet.⁷¹

Bei den Nachtests trat in einer knapp zweijährigen Studie von 2015 bis 2017 kein Fall auf, in dem ein ursprünglich negativ getestetes TK beim zweiten Test an den Tagen 5-7 positiv wurde.¹³⁸

In den im September 2019 neu herausgegebenen Guidelines der FDA können Blutspendedienste zwischen einer einmaligen Testung und einem zweischrittigen Testverfahren wählen. Beim einschrittigen Verfahren erfolgt entweder eine Pathogeninaktivierung innerhalb der ersten 24 Stunden nach Spende oder die Anwendung eines Bakterienschnelltests nach mehr als 36, aber weniger als 48 Stunden. Das TK darf dann bis einschließlich Tag 5 transfundiert werden. Wird der Schnelltest nach 48 Stunden oder später erst angewandt, ist eine Transfusion bis Tag 7 möglich, also zwei Tage länger als bei gleichem Verfahren in Deutschland. Bei der Zweischrittstrategie erfolgt zunächst die Anwendung eines Kulturverfahrens innerhalb der ersten 24 Stunden und einer darauffolgenden Haltbarkeit bis einschließlich Tag 3. Darauf kann ein zweiter Kulturtest ab Tag 3 erfolgen, der die Haltbarkeit bis einschließlich Tag 5 verlängert. Alternativ kann zunächst nach mindestens 36 Stunden ein Schnelltest eingesetzt werden, der eine direkte Haltbarkeit bis einschließlich Tag 5 mit sich bringt. Soll die

Haltbarkeit auf bis zu Tag 7 verlängert werden, muss ein erneuter Kulturtest ab Tag 4 oder ein erneuter Schnelltest durchgeführt werden.¹³⁹

Circa 50 % der US-Blutbanken präferieren das Kulturverfahren weiterhin¹⁴⁰. Aktuelle Forschungen in den USA setzen mit dem Pan Genera Detection - Test auf neue Immunassay-Verfahren zur Bakteriendetektion¹⁴¹.

Eine Kombination von Kultur- und Schnelltestverfahren könnte auch in Deutschland in Zukunft angewandt werden. Jedoch wäre dies wesentlich Ressourcen aufwendiger als ein Monoverfahren. Zu überlegen wäre allerdings, die TK-Haltbarkeit nach bakteriellem Schnelltest, welcher hier frühestens nach 48 Stunden angewandt wird (aktuelle Methode), ebenfalls bis Tag 7 auszuweiten.

Großbritannien hat die 7-tägige Haltbarkeit an ein Bakterienscreening mit Probengewinnung im Zeitraum von 36 bis 48 Stunden nach TK-Produktion und einer zusätzlichen sechsstündigen Quarantäne geknüpft.⁷²

In Canada beträgt die Quarantäne bis zu zwölf Stunden bei sonst gleichen Voraussetzungen.^{142, 143}

Eine weitere Verlängerung der Haltbarkeit zur Steigerung der Ressourcen ist das Ziel vieler Blutspendedienste weltweit. So versuchte beispielsweise Pakistan 2014 mittels einer Studie in der den TKs eine Platelet additive solution (PAS) als Nährlösung zugegeben wurde, die physiologische Qualität bis zu Tag 10 positiv zu beeinflussen. Dies gelang zwar, jedoch stieg im Lagerungsverlauf das Risiko bakterieller Kontamination.¹⁴⁴

Gleich welchen Weg Deutschland in Zukunft einschlägt bezüglich einer Verlängerung der Haltbarkeit und Verhinderung von transfusionsassoziierten bakteriellen Infektionen, wird die Möglichkeit zur Nutzung einer verlässlichen Detektion bakterieller Kontamination nicht wegzudenken sein. Mit der Schaffung der Möglichkeit einer 10er-Pool-Bildung für die derzeit gängigen Systeme Bactiflow als zytometrisch gestütztem Verfahren, der Kulturmethode BacT/ALERT sowie der 16s PCR als PCR-Methode des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen als Screening-Schnelltestverfahren und dem Nachweis valider Ergebnisse auch nach vorangegangener Kühlung, sind daher wichtige Bausteine zur Ressourcenoptimierung verfügbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Risiko bakterieller Infektionen durch Thrombozytenkonzentrate ist derzeit immer noch das höchste in der Transfusionsmedizin. Dies wird hauptsächlich durch die empfindliche Physiologie der Thrombozyten und die damit verbundene erforderliche Lagerung dieser Produkte bei Raumtemperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ bedingt, welche eine optimale Wachstumsbedingung für Bakterien darstellt.

Folgende drei Phasen wurden in der Studie erfolgreich durchlaufen:

Phase 1: Beschreibung von klinischen Transfusionszwischenfällen

Mit Hilfe von predonation sampling und gewissenhaft durchgeführter Hautdesinfektion beim Spender wurden die Grundlagen zur Optimierung der bakteriellen Sicherheit von Thrombozytentransfusionen geschaffen. Allerdings ist die Übertragung von Bakterien bei der Punktion des Spenderarms immer noch die Hauptursache für bakterielle Kontamination von Thrombozytenspenden, wie auch die Untersuchungen der zufälligen Häufungen der Transfusionszwischenfälle im Juni 2016 durch Spenden des DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen zeigte. Eine Erweiterung des Spenderfragebogens bezüglich der Abfrage eines Risikos für die Übertragung multiresistenter Erreger und Kontakt zu besonderen tierischen Risikogruppen sowie die Einführung einer Mundraumkontrolle bei der ärztlichen Untersuchung könnten das Risiko der bakteriellen Kontamination der Blutspende eventuell reduzieren.

Phase 2: Methodenvergleich

Alle drei getesteten Bakterienscreeningmethoden zeigten einen zuverlässigen Bakteriennachweis nach erfolgter Poolbildung von bis zu zehn Thrombozytenkonzentraten sowohl bei Pool- als auch Apherese-TKs.

Bactiflow-Mini-Pooltests konnten 2016 in die Routinetests des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen eingeführt werden und haben in der Zeit von 2016 bis 2019 zum Nachweis von zwölf Bakterienstämmen in Thrombozytenkonzentraten geführt. Die Daten dieser Promotionsarbeit ermöglichen auch die Anwendung der einer generischen 16s-DNA PCR-Methode oder des BacT/ALERT-Verfahrens als eine alternative Schnelltestmethode bei einer Inkubationszeit von zwölf Stunden.

Phase 3: Transportvalidierung

Bei der Transportvalidierung konnte gezeigt werden, dass sowohl bei einem Transport bei Raumtemperatur als auch bei 4°C die Bakterienkonzentration innerhalb von 24 h auch bei 5er- und 10er-Pool-TKs für alle drei Testverfahren nicht unter die Nachweisgrenze fällt. Die Bakterientestung von TKs ist somit auch nach Zentralisierung an den Instituten Frankfurt und Ulm des DRK Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen sowie dem Institut Plauen des DRK Blutspendedienstes Nord-Ost zuverlässig möglich.

Die hiesige Studie konnte dabei helfen, mögliche Ursachen für bakterielle Kontaminationen zu detektieren. Ebenso wurden mit Bactiflow, 16s realtime-PCR und BacT/ALERT drei Bakterienscreeningverfahren erfolgreich für Pools von bis zu zehn Pool- oder Apherese-TKs getestet. Zuletzt konnte auch für alle dieser drei Methoden eine sichere Nutzung nach 24-stündigem Transport sowohl bei Raumtemperatur als auch unter Kühlung bei 4 °C gezeigt werden.

7 SUMMERY

The risk of bacterial infections from platelet concentrates is still the highest in transfusion medicine. This is mainly caused by the fact that platelets were stored at room temperature of $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, which is an optimal growth condition for a broad range of bacteria strains.

The following three phases were successfully completed in the study

Phase 1: Description of clinical transfusion incidents

With the help of predonation sampling and conscientiously performed skin disinfection at the donor, the basis for optimizing the bacterial safety of platelet transfusions was created. However, the transmission of bacteria when puncturing the donor arm is still the main cause of bacterial contamination of platelet concentrates, as was also shown by the studies of the random accumulation of transfusion incidents in June 2016 by donations from the DRK Blood Donation Service Baden-Württemberg-Hessen. An extension of the donor questionnaire regarding the question of risks for transmission of multidrug-resistant pathogens and contact with special animal risk groups, as well as the introduction of an oral cavity control during the medical examination, could possibly reduce the residual risk of bacterial contamination of the blood components.

Phase 2: Comparison of methods

All three bacterial screening methods (Bactiflow, PCR and BacT/ALERT) showed reliable bacterial detection after pooling of up to ten platelet concentrates in buffy coat derived mini-pool or apheresis platelets.

Bactiflow mini pool tests were introduced into the routine tests of the DRK blood donation service Baden-Württemberg-Hessen in 2016 and led to the detection of twelve bacterial strains in platelet concentrates from 2016 to 2019. The data of this doctoral thesis also allow the use of a generic 16s DNA-PCR method or the use of the BacT/ALERT method as an alternative rapid test method with an incubation period of 12 hours.

Phase 3: Transport validation

During the transport validation, it could be shown that both conditions (transport at room temperature and at 4 ° C), enables sufficient bacterial detection in individual donations, in mini-pools of five or in mini-pools of ten platelet concentrates. Bacterial testing of platelets is therefore reliably possible even after centralization at the DRK Blood Donation Service Baden-Württemberg-Hessen at the institutes Frankfurt and Ulm and the DRK Blood Donation Service Nord-Ost at the institute Plauen.

The presented study was able to improve the residual risk for bacterial contaminations in platelet concentrates. The Bactiflow method, the 16s real-time PCR method and the BacT/ALERT method were sufficient for routine bacterial screening in platelet concentrates up to a maximum mini-pool size of 10 products per mini-pool. Bacterial screening is possible in buffy coat derived pool-platelets as well as in apheresis platelets. Finally, safe use after 24 hours of transport could be demonstrated for all of these three methods, both at room temperature and under cooling at 4 ° C.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Müller TH, Mohr H, Montag T. Methods for the detection of bacterial contamination in blood products. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(7):933–946. doi:10.1515/CCLM.2008.154.
2. Sireis W, Rüster B, Daiss C, et al. Extension of platelet shelf life from 4 to 5 days by implementation of a new screening strategy in Germany. *Vox Sang.* 2011;101(3):191–199. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01485.x.
3. Dr. Benjamin Müller, Dr. med. Volkmar Schottstedt. Screening von Thrombozytenkonzentraten auf bakterielle Kontaminationen: Diagnostische Methoden und aktuelle Entwicklungen. *DRK Hämotherapie.* 2015(24).
4. Bradley, R.M., Gander, R.M., Patel, S.K., and Kaplan, H.S. Inhibitory effect of 0°C storage on the proliferation of *Yersinia enterocolitica* in donated blood. *Transfusion.* 1997(37):691–695.
5. Gibb AP, Martin KM, Davidson GA, Walker B, Murphy WG. Modeling the growth of *Yersinia enterocolitica* in donated blood. *Transfusion.* 1994;34(4):304–310. doi:10.1046/j.1537-2995.1994.34494233577.x.
6. Hingston PA, Truelstrup Hansen L, Pombert J-F, Wang S. Characterization of *Listeria monocytogenes* enhanced cold-tolerance variants isolated during prolonged cold storage. *Int J Food Microbiol.* 2019;306:108262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108262.
7. Robert Koch-Institut (RKI). Epidemiologisches Bulletin 49 / 2006.
8. Bundesärztekammer. Richtlinie Hämotherapie 2017 mit E/A 2019:40.
9. Bundesärztekammer, ed. *Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten: Mit 19 Tabellen.* 4th ed. Köln: Dt. Ärzte-Verl.; 2009.
10. Robert Koch-Institut (RKI). Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit Zusätzliche Risikovorsorge bei Blutspenden. Beschleunigte Einführung der Leukozytendepletion und Spenderausschluss bei mehr als sechsmonatigem Aufenthalt im Vereinigten Königreich. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2001;44(1):110–111. doi:10.1007/s001030050418.
11. Burger R. KR. Einführung des „Predonation Sampling“. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz.* 2002;45(9):756. doi:10.1007/s00103-002-0463-7.

12. Korte D de, 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(1):13–16. doi:10.1046/j.1423-0410.2002.00189.x.
13. Bundesärztekammer. Richtlinie Hämotherapie 2017 mit E/A 2019:34.
14. Müller, M., Seifried, E. Neues aus der Rubrik „Was tun wir bei ...?“. *DRK Hämotherapie.* 2016(26):35–40.
15. Bundesärztekammer. Richtlinie Hämotherapie 2017 mit E/A 2019:64.
16. Langenscheidt F, Kiefel V, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Platelet transfusion refractoriness associated with two rare platelet-specific alloantibodies (anti-Baka and anti-PIA2) and multiple HLA antibodies. *Transfusion.* 1988;28(6):597–600. doi:10.1046/j.1537-2995.1988.28689059040.x.
17. Kreissig C. Granulozytentransfusionen bei Patienten mit Granulozytopenie oder -pathie. *DRK Hämotherapie.* 2013(20):13–18.
18. Vollmer T, Schottstedt V, Bux J, Walther-Wenke G, Knabbe C, Dreier J. Bacterial screening of platelet concentrates on day 2 and 3 with flow cytometry. The optimal sampling time point? *Blood Transfus.* 2014;12(3):388–395. doi:10.2450/2014.0175-13.
19. Robert Koch-Institut (RKI). Wissenschaftliche Erläuterungen zur Stellungnahme "Bewertung von Apherese- und Pool-Thrombozytenkonzentraten" des AK Blut vom 31.03.2015. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2015;58(10):1137. doi:10.1007/s00103-015-2231-5.
20. Bundesärztekammer. Richtlinie Hämotherapie 2017 mit E/A 2019:34–49.
21. Valsami S, Dimitroulis D, Gialeraki A, Chimonidou M, Politou M. Current trends in platelet transfusions practice. The role of ABO-RhD and human leukocyte antigen incompatibility. *Asian J Transfus Sci.* 2015;9(2):117–123. doi:10.4103/0973-6247.162684.
22. Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, Ouwehand WH, Metcalfe P. Genotyping for platelet-specific antigens. Techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sang.* 2002;83(1):1–12. doi:10.1046/j.1423-0410.2002.00187.x.
23. Lozano M, Cid J. The clinical implications of platelet transfusions associated with ABO or Rh(D) incompatibility. *Transfus Med Rev.* 2003;17(1):57–68. doi:10.1053/tmrv.2003.50003.
24. Nagel D. Welche Relevanz haben Isohämolysine in Pool-Thrombozytenkonzentraten.

- DRK Hämotherapie*. 2013(21):24–29.
25. Gelb AB, Leavitt AD. Crossmatch-compatible platelets improve corrected count increments in patients who are refractory to randomly selected platelets. *Transfusion*. 1997;37(6):624–630. doi:10.1046/j.1537-2995.1997.37697335157.x.
 26. Bolton-Maggs PHB, Cohen H. Serious Hazards of Transfusion (SHOT) haemovigilance and progress is improving transfusion safety. *Br J Haematol*. 2013;163(3):303–314. doi:10.1111/bjh.12547.
 27. Bux J. Die transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz. *DRK Hämotherapie*. 2015(05):4–11.
 28. King KE, Shirey RS, Thoman SK, Bensen-Kennedy D, Tanz WS, Ness PM. Universal leukoreduction decreases the incidence of febrile nonhemolytic transfusion reactions to RBCs. *Transfusion*. 2004;44(1):25–29. doi:10.1046/j.0041-1132.2004.00609.x.
 29. Kretschmer V, Weippert-Kretschmer M, Karger R. Notfall- und Massivtransfusion. *Transfus Med Hemother*. 2004;24(2):106–113. doi:10.1159/000223476.
 30. Popovsky MA. Transfusion and the lung. Circulatory overload and acute lung injury. *Vox Sang*. 2004;87 Suppl 2:62–65. doi:10.1111/j.1741-6892.2004.00453.x.
 31. Watkins NA, Smethurst PA, Allen D, Smith GA, Ouwehand WH. Platelet alphaIIb beta3 recombinant autoantibodies from the B-cell repertoire of a post-transfusion purpura patient. *Br J Haematol*. 2002;116(3):677–685. doi:10.1046/j.0007-1048.2001.03301.x.
 32. 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(6):528–543. doi:10.1159/000096293.
 33. Bundesärztekammer. Richtlinie Hämotherapie 2017 mit E/A 2019:28.
 34. Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, et al. Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing. Results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion*. 2008;48(8):1558–1566. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01718.x.
 35. Fiedler SA, Oberle D, Chudy M, et al. Effectiveness of blood donor screening by HIV, HCV, HBV-NAT assays, as well as HBsAg and anti-HBc immunoassays in Germany (2008-2015). *Vox Sang*. 2019;114(5):443–450. doi:10.1111/vox.12770.
 36. Shyamala V, Arcangel P, Cottrell J, et al. Assessment of the target-capture PCR

- hepatitis B virus (HBV) DNA quantitative assay and comparison with commercial HBV DNA quantitative assays. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5199–5204. doi:10.1128/JCM.42.11.5199-5204.2004.
37. Marwaha N, Sachdev S. Current testing strategies for hepatitis C virus infection in blood donors and the way forward. *World J Gastroenterol.* 2014;20(11):2948–2954. doi:10.3748/wjg.v20.i11.2948.
 38. Kacker S, Bloch EM, Ness PM, et al. Financial impact of alternative approaches to reduce bacterial contamination of platelet transfusions. *Transfusion.* 2019;59(4):1291–1299. doi:10.1111/trf.15139.
 39. Ainley LI, Hewitt PE. Haematology patients and the risk of transfusion transmitted infection. *Br J Haematol.* 2018;180(4):473–483. doi:10.1111/bjh.15030.
 40. Robert Koch-Institut (RKI). Epidemiologisches Bulletin 41/2017.
 41. Brandenburg K, Schürholz T. Lack of new antiinfective agents. Passing into the pre-antibiotic age? *World J Biol Chem.* 2015;6(3):71–77. doi:10.4331/wjbc.v6.i3.71.
 42. Paul-Ehrlich-Institut. Hämovigilanz-Bericht 2013/14.
 43. Paul-Ehrlich-Institut. Hämovigilanz-Bericht 2015.
 44. Paul-Ehrlich-Institut. Hämovigilanzbericht 2016/2017.
 45. Paul-Ehrlich-Institut. Hämovigilanz-Bericht 2018.
 46. Lozano M, Cid J. Analysis of reasons for not implementing pathogen inactivation for platelet concentrates. *Transfus Clin Biol.* 2013;20(2):158–164. doi:10.1016/j.tracli.2013.02.017.
 47. Walther-Wenke G, Schrezenmeier H, Deitenbeck R, 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(1):83–91. doi:10.1007/s00277-009-0762-2.
 48. Puckett A, Davison G, Entwistle CC, Barbara JA. Post transfusion septicaemia 1980-1989. Importance of donor arm cleansing. *J Clin Pathol.* 1992;45(2):155–157. doi:10.1136/jcp.45.2.155.
 49. Korte D de, Curvers J, Kort WLAM de, et al. Effects of skin disinfection method, deviation bag, and bacterial screening on clinical safety of platelet transfusions in the Netherlands. *Transfusion.* 2006;46(3):476–485. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00746.x.
 50. McDonald CP, Roy A, Mahajan P, Smith R, Charlett A, Barbara JAJ. Relative values

- of the interventions of diversion and improved donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. *Vox Sang.* 2004;86(3):178–182.
doi:10.1111/j.0042-9007.2004.00404.x.
51. McDonald C, McGuane S, Thomas J, et al. A novel rapid and effective donor arm disinfection method. *Transfusion.* 2010;50(1):53–58. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02332.x.
 52. BGH. Garantenstellung des stellvertretenden Leiters eines Universitätsinstituts für Leben und Gesundheit. *MedR Medizinrecht.* 2000;18(11):529–532.
doi:10.1007/s003500000365.
 53. Heltberg O, Skov F, Gerner-Smidt P, et al. Nosocomial epidemic of *Serratia marcescens* septicemia ascribed to contaminated blood transfusion bags. *Transfusion.* 1993;33(3):221–227. doi:10.1046/j.1537-2995.1993.33393174448.x.
 54. Högman CF, Gong J. Studies of one invasive and two noninvasive methods for detection of bacterial contamination of platelet concentrates. *Vox Sang.* 1994;67(4):351–355. doi:10.1111/j.1423-0410.1994.tb01272.x.
 55. Dyer O. Blood authority investigates faulty blood bags. *BMJ.* 1995;311(6998):145.
doi:10.1136/bmj.311.6998.145.
 56. Chang CY, Furlong L-A. Microbial stowaways in topical antiseptic products. *N Engl J Med.* 2012;367(23):2170–2173. doi:10.1056/NEJMp1212680.
 57. McDonald CP. Bacterial risk reduction by improved donor arm disinfection, diversion and bacterial screening. *Transfus Med.* 2006;16(6):381–396.
doi:10.1111/j.1365-3148.2006.00697.x.
 58. Prax M, Bekeredjian-Ding I, Krut O. Microbiological Screening of Platelet Concentrates in Europe. *Transfus Med Hemother.* 2019;46(2):76–86.
doi:10.1159/000499349.
 59. Roth, WK., Seifried, E. Infektionsrisiken. durch Blutkomponenten und Blutprodukte. *DRK Hämotherapie.* 2003(1):22–35.
 60. Thyer J, Perkowska-Guse Z, Ismay SL, et al. Bacterial testing of platelets - has it prevented transfusion-transmitted bacterial infections in Australia? *Vox Sang.* 2018;113(1):13–20. doi:10.1111/vox.12561.
 61. Walther-Wenke G. Bakteriell bedingte Transfusionsreaktionen durch Thrombozytenkonzentrate. *DRK Hämotherapie.* 2007(10):12–21.
 62. Walther-Wenke G, Doerner R, Montag T, et al. Bacterial contamination of platelet

- concentrates prepared by different methods. Results of standardized sterility testing in Germany. *Vox Sang.* 2006;90(3):177–182. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00753.x.
63. Robert Koch-Institut (RKI). Festlegung der Haltbarkeitsfrist von Thrombozytenkonzentraten mit dem Ziel der Reduktion lebensbedrohlicher septischer Transfusionsreaktionen durch bakterielle Kontamination. Bei der 66. Sitzung des Arbeitskreises Blut am 9. Juni 2008 wurde folgendes Votum (V 38) verabschiedet. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2008;51(12):1484. doi:10.1007/s00103-008-0723-2.
 64. Müller B, Walther-Wenke G, Kalus M, et al. Routine bacterial screening of platelet concentrates by flow cytometry and its impact on product safety and supply. *Vox Sang.* 2015;108(3):209–218. doi:10.1111/vox.12214.
 65. Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):195–204. doi:10.1128/CMR.18.1.195-204.2005.
 66. Brecher ME, Hay SN. Improving platelet safety. Bacterial contamination of platelets. *Curr Hematol Rep.* 2004;3(2):121–127.
 67. Ezuki S, Kawabata K, Kanno T, Ohto H. Culture-based bacterial detection systems for platelets. The effect of time prior to sampling and duration of incubation required for detection with aerobic culture. *Transfusion.* 2007;47(11):2044–2049. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01428.x.
 68. McDonald CP. Transfusion risk reduction. Testing for bacteria. *VOXS.* 2013;8(1):73–79. doi:10.1111/voxs.12013.
 69. Dreier J, Vollmer T, Kleesiek K. Novel flow cytometry-based screening for bacterial contamination of donor platelet preparations compared with other rapid screening methods. *Clin Chem.* 2009;55(8):1492–1502. doi:10.1373/clinchem.2008.122515.
 70. Benjamin RJ, McDonald CP. The international experience of bacterial screen testing of platelet components with an automated microbial detection system. A need for consensus testing and reporting guidelines. *Transfus Med Rev.* 2014;28(2):61–71. doi:10.1016/j.tmr.2014.01.001.
 71. Harm SK, Szczepiorkowski ZM, Dunbar NM. Routine use of Day 6 and Day 7 platelets with rapid testing. Two hospitals assess impact 1 year after implementation. *Transfusion.* 2018;58(4):938–942. doi:10.1111/trf.14473.
 72. McDonald C, Allen J, Brailsford S, et al. Bacterial screening of platelet components by National Health Service Blood and Transplant, an effective risk reduction

- measure. *Transfusion*. 2017;57(5):1122–1131. doi:10.1111/trf.14085.
73. Vollmer T, Hinse D, Schottstedt V, et al. Inter-laboratory comparison of different rapid methods for the detection of bacterial contamination in platelet concentrates. *Vox Sang*. 2012;103(1):1–9. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01572.x.
74. Vollmer T, Knabbe C, Dreier J. Novel flow cytometric screening method for bacterial contamination of red blood cells. A proof-of-principle evaluation. *Transfusion*. 2014;54(3 Pt 2):900–909. doi:10.1111/trf.12513.
75. Janetzko K, Schmidt M. Verlängerung der Haltbarkeitsdauer von Thrombozytenkonzentraten von 4 auf 5 Tage. *Transfusionsmedizin*. 2015;5(01):27–30. doi:10.1055/s-0034-1396188.
76. Waters L, Cameron M, Padula MP, Marks DC, Johnson L. Refrigeration, cryopreservation and pathogen inactivation. An updated perspective on platelet storage conditions. *Vox Sang*. 2018;113(4):317–328. doi:10.1111/vox.12640.
77. Sabaté Brescó M, Harris LG, Thompson K, et al. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus epidermidis Device-Related Infection. *Front Microbiol*. 2017;8:1401. doi:10.3389/fmicb.2017.01401.
78. Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P, eds. *Mikrobiologische Diagnostik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
79. Taponen S, Liski E, Heikkilä A-M, Pyörälä S. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, Streptococcus dysgalactiae, Corynebacterium bovis, or Escherichia coli. *J Dairy Sci*. 2017;100(1):493–503. doi:10.3168/jds.2016-11465.
80. Oh S-I, Kim JW, Jung J-Y, et al. Pathologic and molecular characterization of Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis infection in neonatal piglets. *J Vet Sci*. 2018;19(2):313–317. doi:10.4142/jvs.2018.19.2.313.
81. Vandamme P, Pot B, Falsen E, Kersters K, Devriese LA. Taxonomic study of lancefield streptococcal groups C, G, and L (Streptococcus dysgalactiae) and proposal of S. dysgalactiae subsp. equisimilis subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46(3):774–781. doi:10.1099/00207713-46-3-774.
82. Traverso F, Blanco A, Villalón P, Beratz N, Sáez Nieto JA, Lopardo H. Molecular characterization of invasive Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis. Multicenter study. Argentina 2011-2012. *Rev Argent Microbiol*. 2016;48(4):279–289. doi:10.1016/j.ram.2016.07.001.

83. Wajima T, Morozumi M, Hanada S, et al. Molecular Characterization of Invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, Japan. *Emerging Infect Dis.* 2016;22(2):247–254. doi:10.3201/eid2202.141732.
84. Highsmith AK, Jarvis WR. *Klebsiella pneumoniae*. Selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infect Control.* 1985;6(2):75–77. doi:10.1017/s0195941700062640.
85. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:4. doi:10.3389/fcimb.2018.00004.
86. Bassetti M, Pecori D, Peghin M. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria-resistant infections. Epidemiology, clinical issues and therapeutic options. *Ital J Med.* 2016;10(4):364. doi:10.4081/itjm.2016.802.
87. Flint S, Walker K, Waters B, Crawford R. Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders. *J Appl Microbiol.* 2007;102(4):909–915. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03167.x.
88. Petershofen EK, Fislage R, Faber R, Schmidt H, Roth WK, Seifried E. Detection of nucleic acid sequences from bacterial species with molecular genetic methods. *Transfus Sci.* 2000;23(1):21–27. doi:10.1016/s0955-3886(00)00051-5.
89. Schmidt M, Karakassopoulos A, Burkhart J, et al. Comparison of three bacterial detection methods under routine conditions. *Vox Sang.* 2007;92(1):15–21. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00850.x.
90. Sun Y, Wallrabe H, Seo S-A, Periasamy A. FRET microscopy in 2010. The legacy of Theodor Förster on the 100th anniversary of his birth. *Chemphyschem.* 2011;12(3):462–474. doi:10.1002/cphc.201000664.
91. Schmidt M, Hourfar MK, Nicol S-B, et al. A comparison of three rapid bacterial detection methods under simulated real-life conditions. *Transfusion.* 2006;46(8):1367–1373. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00904.x.
92. Benjamin RJ, Braschler T, Weingand T, Corash LM. Hemovigilance monitoring of platelet septic reactions with effective bacterial protection systems. *Transfusion.* 2017;57(12):2946–2957. doi:10.1111/trf.14284.
93. Vollmer T, Dabisch-Ruthe M, Weinstock M, Knabbe C, Dreier J. Late sampling for automated culture to extend the platelet shelf life to 5 days in Germany. *Transfusion.* 2018;58(7):1654–1664. doi:10.1111/trf.14617.

94. Vollmer T, Dreier J, Schottstedt V, et al. Detection of bacterial contamination in platelet concentrates by a sensitive flow cytometric assay (BactiFlow). A multicentre validation study. *Transfus Med.* 2012;22(4):262–271. doi:10.1111/j.1365-3148.2012.01166.x.
95. Sireis W, Hourfar MK, Seifried E, Schmidt M. How to improve blood safety with respect to bacterial contaminations? *Vox Sang.* 2012;103(1):87–88. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01582.x.
96. Robert Koch-Institut (RKI). Pathogen-Inaktivierungssysteme für Thrombozytenkonzentrate Stellungnahme - Bundesgesundheitsblatt 7/2018.
97. Goris RJ. Mediators of multiple organ failure. *Intensive Care Med.* 1990;16 Suppl 3:S192-6. doi:10.1007/bf01709699.
98. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al. BacT/Alert. An automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1608–1612.
99. Kaiser-Guignard J, Canellini G, Lion N, Abonnenc M, Osselaer J-C, Tissot J-D. The clinical and biological impact of new pathogen inactivation technologies on platelet concentrates. *Blood Rev.* 2014;28(6):235–241. doi:10.1016/j.blre.2014.07.005.
100. Schmidt M, Hourfar MK, Sireis W, et al. Evaluation of the effectiveness of a pathogen inactivation technology against clinically relevant transfusion-transmitted bacterial strains. *Transfusion.* 2015;55(9):2104–2112. doi:10.1111/trf.13171.
101. Estcourt LJ, Malouf R, Hopewell S, et al. Pathogen-reduced platelets for the prevention of bleeding. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;7:CD009072. doi:10.1002/14651858.CD009072.pub3.
102. Jóhannsson F, Árnason NÁ, Landrö R, Guðmundsson S, Sigurjonsson ÓE, Rolfsson Ó. Metabolomics study of platelet concentrates photochemically treated with amotosalen and UVA light for pathogen inactivation. *Transfusion.* 2020;60(2):367–377. doi:10.1111/trf.15610.
103. Seltsam A. Pathogenreduktion von Blutprodukten - ein Paradigmenwechsel in der Transfusionsmedizin. *DRK Hämotherapie.* 2011(17):26–34.
104. Irsch J, Lin L. Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood Components for Transfusion Using the INTERCEPT Blood System™. *Transfus Med Hemother.* 2011;38(1):19–31. doi:10.1159/000323937.
105. Kenzelmann Melanie. Vorlage für eine Fachinformation. Swissmedic.
106. Knutson F, Osselaer J, Pierelli L, et al. A prospective, active haemovigilance study

- with combined cohort analysis of 19,175 transfusions of platelet components prepared with amotosalen-UVA photochemical treatment. *Vox Sang*. 2015;109(4):343–352. doi:10.1111/vox.12287.
107. Vetlesen A, Mirlashari MR, Akkök CA, et al. Biological response modifiers in photochemically pathogen-reduced versus untreated apheresis platelet concentrates. *Transfusion*. 2013;53(1):147–155. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03681.x.
 108. Bundesärztekammer. Richtlinie Hämotherapie 2017 mit E/A 2019:41–42.
 109. Chavarin P, DePutter C, Boussoulade F, et al. Inactivation/réduction des pathogènes des concentrés de plaquettes. Conséquences sur l'organisation de la transfusion plaquettaire. *Transfus Clin Biol*. 2011;18(4):472–477. doi:10.1016/j.tracli.2011.04.002.
 110. Marschner S, Goodrich R. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light. *Transfus Med Hemother*. 2011;38(1):8–18. doi:10.1159/000324160.
 111. Terada C, Shiba M, Nagai T, Satake M. Effects of riboflavin and ultraviolet light treatment on platelet thrombus formation and thrombus stability on collagen. *Transfusion*. 2017;57(7):1772–1780. doi:10.1111/trf.14114.
 112. Johnson L, Marks D. Treatment of Platelet Concentrates with the Mirasol Pathogen Inactivation System Modulates Platelet Oxidative Stress and NF-κB Activation. *Transfus Med Hemother*. 2015;42(3):167–173. doi:10.1159/000403245.
 113. Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*. 2005;45(6):911–919. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04350.x.
 114. Lachert E, Woźniak J, Antoniewicz-Papis J, et al. Study of CD69 antigen expression and integrity of leukocyte cellular membrane in stored platelet concentrates following irradiation and treatment with Mirasol® PRT System. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26(1):7–13. doi:10.17219/acem/68290.
 115. Bakkour S, Chafets DM, Wen L, et al. Development of a mitochondrial DNA real-time polymerase chain reaction assay for quality control of pathogen reduction with riboflavin and ultraviolet light. *Vox Sang*. 2014;107(4):351–359. doi:10.1111/vox.12173.
 116. van der Meer PF, Gravemann U, Korte D de, et al. Effect of increased agitation speed on pathogen inactivation efficacy and in vitro quality in UVC-treated platelet

- concentrates. *Vox Sang*. 2016;111(2):127–134. doi:10.1111/vox.12404.
117. Kim S, Handke W, Gravemann U, et al. Mitochondrial DNA multiplex real-time polymerase chain reaction inhibition assay for quality control of pathogen inactivation by ultraviolet C light in platelet concentrates. *Transfusion*. 2018;58(3):758–765. doi:10.1111/trf.14464.
 118. Jocić M, Trkuljić M, Jovicić D, Borovcanin N, Todorović M, Balint B. Mirasol PRT system inactivation efficacy evaluated in platelet concentrates by bacteria-contamination model. *Vojnosanit Pregl*. 2011;68(12):1041–1046.
 119. Prowse CV. Component pathogen inactivation. A critical review. *Vox Sang*. 2013;104(3):183–199. doi:10.1111/j.1423-0410.2012.01662.x.
 120. Norris PJ, Kaidarova Z, Maiorana E, et al. Ultraviolet light-based pathogen inactivation and alloimmunization after platelet transfusion. Results from a randomized trial. *Transfusion*. 2018;58(5):1210–1217. doi:10.1111/trf.14534.
 121. Rebullà P, Vaglio S, Beccaria F, et al. Clinical effectiveness of platelets in additive solution treated with two commercial pathogen-reduction technologies. *Transfusion*. 2017;57(5):1171–1183. doi:10.1111/trf.14042.
 122. Gravemann U, Handke W, Müller TH, Seltsam A. Bacterial inactivation of platelet concentrates with the THERAFLEX UV-Platelets pathogen inactivation system. *Transfusion*. 2019;59(4):1324–1332. doi:10.1111/trf.15119.
 123. Greco C, Martincic I, Gusinjac A, Kalab M, Yang A-F, Ramírez-Arcos S. *Staphylococcus epidermidis* forms biofilms under simulated platelet storage conditions. *Transfusion*. 2007;47(7):1143–1153. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01249.x.
 124. Ketter PM, Kamucheka R, Arulanandam B, Akers K, Cap AP. Platelet enhancement of bacterial growth during room temperature storage. Mitigation through refrigeration. *Transfusion*. 2019;59(S2):1479–1489. doi:10.1111/trf.15255.
 125. Ng MSY, Tung J-P, Fraser JF. Platelet Storage Lesions. What More Do We Know Now? *Transfus Med Rev*. 2018. doi:10.1016/j.tmr.2018.04.001.
 126. Marini I, Tamamushi Y., Althaus K. Kalllagerung von Thrombozyten: Aktuelle Herausforderungen und zukünftige Perspektiven. *DRK Hämotherapie*. 2019(33):4–11.
 127. Johnson L, Cameron M, Waters L, Padula MP, Marks DC. The impact of refrigerated storage of UVC pathogen inactivated platelet concentrates on in vitro

- platelet quality parameters. *Vox Sang.* 2019;114(1):47–56. doi:10.1111/vox.12730.
128. Meybohm P, Westphal S, Zacharowski K. Hämorrhagischer Schock: Transfusionstrigger, „Wie viel Hb braucht ein Mensch?“. *DIVI Jahrbuch 2019/2020.*
129. Meybohm P., Schmitz-Rixen T., Steinbicker A., Schwenk W., Zacharowski K. Der Chirurg 10/2017 Das Patient-Blood-Management-Konzept. Gemeinsame Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. *Der Chirurg.* 2017(10):867–870.
130. Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) in Kooperation mit der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). S3 Leitlinie Präoperative Anämie.
131. Klausen SS, Hervig T, Seghatchian J, Reikvam H. Bacterial contamination of blood components. Norwegian strategies in identifying donors with higher risk of inducing septic transfusion reactions in recipients. *Transfus Apher Sci.* 2014;51(2):97–102. doi:10.1016/j.transci.2014.08.007.
132. Wagner SJ, Benjamin RJ, Hapip CA, et al. Investigation of bacterial inactivation in apheresis platelets with 24 or 30 hours between inoculation and inactivation. *Vox Sang.* 2016;111(3):226–234. doi:10.1111/vox.12410.
133. Schlenke P. Pathogen inactivation technologies for cellular blood components. An update. *Transfus Med Hemother.* 2014;41(4):309–325. doi:10.1159/000365646.
134. Chetouane Y, Dubourg G, Gallian P, et al. Rapid identification of microorganisms from platelet concentrates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry after short-term incubation on liquid medium. *Transfusion.* 2018;58(3):766–773. doi:10.1111/trf.14430.
135. Vossier L, Valera L, Leon F, et al. Combining culture and microbead-based immunoassay for the early and generic detection of bacteria in platelet concentrates. *Transfusion.* 2019;59(1):277–286. doi:10.1111/trf.15019.
136. Aubron C, Flint AWJ, Ozier Y, McQuilten Z. Platelet storage duration and its clinical and transfusion outcomes. A systematic review. *Crit Care.* 2018;22(1):185. doi:10.1186/s13054-018-2114-x.
137. Levy JH, Neal MD, Herman JH. Bacterial contamination of platelets for transfusion. Strategies for prevention. *Crit Care.* 2018;22(1):271. doi:10.1186/s13054-018-2212-9.
138. Ruby KN, Thomasson RR, Szczepiorkowski ZM, Dunbar NM. Bacterial

- screening of apheresis platelets with a rapid test. A 113-month single center experience. *Transfusion*. 2018;58(7):1665–1669. doi:10.1111/trf.14629.
139. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Bacterial Risk Control Strategies for Blood Collection Establishments and Transfusion Services to Enhance the Safety and Availability of Platelets for Transfusion. Draft Guidance for Industry. 2019(FDA-2014-D-1814-0126).
 140. Lu W, Delaney M, Dunbar NM, Rossmann SN, Fung M. A national survey of hospital-based transfusion services on their approaches to platelet bacterial risk mitigation in response to the FDA final guidance for industry. *Transfusion*. 2020. doi:10.1111/trf.15851.
 141. Alrabeih R, Korte L, Reyes M, Hartwell E, Bracey A. Long-term Experience with Rapid Screening for Platelet Bacterial Contamination in a High-volume Transfusion Service. *Ann Clin Lab Sci*. 2019;49(6):748–755.
 142. Delage G, Bernier F, Beaudoin J, et al. Improved bacterial culture of platelet product: preliminary results after implementation of a two - bottle system with 48h sampling. *Transfusion*. 2016;24:A28.
 143. Ramirez - Arcos S, Taha M, Kou Y, Mastronardi C, Yi Q, Goldman M. Improved bacterial detection algorithm supports extension of platelet storage from 5 to 7 days at Canadian blood services (P - 197). *Vox Sang*. 2017;112:134.
 144. Mohsin S, Rehman M, Saeed T, Amin H, Bashir S, Hussain S. Comparison of changes in platelet count, mean platelet volume and swirling in stored platelet concentrates with and without platelet additive solution. *J Appl Hematol*. 2014;5(1):10. doi:10.4103/1658-5127.131819.

9 EIGENE VERÖFFENTLICHUNG

Eingereicht bei *Transfusion*:

Michael Schmidt, Lea Stiller, Sandra Ramirez-Arcos, Carl McDonald, and the ISBT Transfusion-Transmitted Infectious Diseases Working Party, Subgroup on Bacteria.

Current status of rapid bacterial detection methods in platelet concentrates – A 20-year review by the ISBT Transfusion Transmitted Infectious Diseases Bacterial Subgroup working group

Geplante Veröffentlichung bei *Vox Sanguis*:

Markus M. Mueller, MD; Brigitte Ruester, PhD; M. Kai Hourfar, PhD; Lea Andrea Heike Stiller; Erhard Seifried, MD, PhD; Michael Schmidt, MD, PhD.

Bacterial Screening of Platelet Concentrates: Methods, Pooling and Logistics

10 LEBENSLAUF

11 DANKSAGUNG

12 SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Effizienz von bakteriellen Schnelltestmethoden am Beispiel von Thrombozytenkonzentraten“

in dem DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Michael Schmidt mit Unterstützung durch Frau Dr. Brigitte Rüster ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit werden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: Geplant:

Michael Schmidt, Lea Stiller, Sandra Ramirez-Arcos, Carl McDonald, and the ISBT Transfusion-Transmitted Infectious Diseases Working Party, Subgroup on Bacteria, Current status of rapid bacterial detection methods in platelet concentrates – A 20-year review by the ISBT Transfusion Transmitted Infectious Diseases Bacterial Subgroup working group, *Transfusion*

Markus M. Mueller, MD; Brigitte Ruester, PhD; M. Kai Hourfar, PhD; Lea Andrea Heike Stiller; Erhard Seifried, MD, PhD; Michael Schmidt, MD, PhD. Bacterial Screening of Platelet Concentrates: Methods, Pooling and Logistics, *Vox sanguis*

Dehrn, 12.09.2020

(Ort, Datum)

(Unterschrift)