

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin  
Leiter: Prof. Dr. W. Mempel  
In der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Großhadern  
Vorstand: Prof. Dr.med. W. Hiddemann  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Der Einfluß der Kryokonservierung auf die mikrobielle Kontamination von  
Stammzellapheresaten

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Andrea Blecks  
aus  
München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. W. Mempel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Aepfelbacher  
Priv. Doz. Dr. J. Haas

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. O. Ochmann  
Dr. med. B. Grabein

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2003

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Entwicklung der modernen Stammzelltherapie	1
1.2 Die autologe und die allogene Stammzelltransplantation	1
1.3 Anwendungsbereiche der Stammzelltransplantation	3
1.4 Die Kryokonservierung von Blutstammzellen	6
1.5 Das Problem der mikrobiellen Kontamination von Stammzellapherisaten	6
1.6 Ziel der vorliegenden Studie	9
 2. METHODIK	 11
2.1 Studiendesign	11
2.2 Auswahl der Spender	11
2.2.1 Ethik	11
2.2.2 Einschlußkriterien	11
2.2.3 Ausschlußkriterien	12
2.2.4 Zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen	12
2.3 Auswahl der Mikroorganismen	12
2.3.1 Auswahlkriterien	12
2.3.2 Verwendete Keime	13
2.3.2.1 Staphylokokkus aureus	13
2.3.2.2 Koagulase negative Staphylokokken	13
2.3.2.3 Escherichia coli	13
2.3.2.4 Pseudomonas aeruginosa	13
2.3.2.5 Candida albicans	14
2.3.3 Yersinia enterocolitica	14
2.4 MNC-Gewinnung	14
2.4.1 Venöse Zugänge	14
2.4.2 Antikoagulation	15
2.4.3 Zytapherese	15
2.4.3 Nebenwirkungen	15
2.4.4 Abbruchkriterien	15
2.5 Klinische Befunde	15
2.5.1 Anamnese	15

2.5.2	Körperliche Untersuchung	16
2.6	Meßgrößen	16
2.7	Kontamination des MNC-Konzentrats	16
2.8	Kryokonservierung	16
2.9	Auftauen	17
2.10	Beimpfen der Kulturfläschchen	17
2.11	Weiterverarbeitung in der Mikrobiologie	17
2.12	Versuchsablauf	17
2.12.1	Vorversuch zur Erzielung korrekter Keimzahlen bei der Herstellung unterschiedlicher Verdünnungsstufen von Keimsuspensionen	17
2.12.2	Pilotstudie zur Bestimmung der Keimnachweisgrenzen der Erreger im Apherisat	19
2.12.3	Hauptstudie mit Kryokonservierung des gezielt bakteriell kontaminierten Apherisats	20
2.13	Dokumentation	21
2.14	Auswertung	21
3.	ERGEBNISSE	22
3.1	Spender	22
3.1.1	Morphometrische Daten	22
3.1.2	Blutbildparameter	25
3.1.3	Infektionsparameter	37
3.1.4	Zusammenhang zwischen Lymphozytenzahl bei Blutentnahme und MNC-Ausbeute im Apherisat	39
3.2	Mikrobiologie	41
3.2.1	Ergebnisse des Vorversuches	41
3.2.2	Resultate der Pilotstudie	44
3.2.3	Auswertung des Hauptversuches	47
4.	DISKUSSION	49
4.1	Schwierigkeiten bei der Herstellung quantitativ objektivierbar korrekter Keimsuspensionen	49
4.2	Spenderbelastung	51
4.3	Pilotstudie	51
4.4	Diskussion der Ergebnisse des Hauptversuches	52
4.4.1	Vorstellbare Schädigungen auf zellulärer Ebene während der Kryokonservierung	56
4.4.1.1	Allgemein auftretende Zellschäden beim Einfriervorgang	56

4.4.1.2 Zytotoxizität von DMSO	57
4.4.2 Technische Schwierigkeiten bei der Durchführung des Hauptversuches	58
4.4.3 Weitere vorstellbare Erklärungsansätze für einen negativen Keimnachweis in kryokonservierten Apheresatproben	58
4.4.3.1 Phagozytose der Bakterien durch zur Phagozytose-befähigte Zellen im Apheresat	58
4.4.3.2 Falsch negative Blutkulturen	60
4.5 Weitere vorstellbare Verfahren zur Erzielung einer nachträglichen Keimfreiheit in einem bereits gewonnenen, aber mikrobiell kontaminierten Apheresat	61
4.5.1 Bestrahlung von Blutprodukten	61
4.5.2 Einsatz von Antibiotika	61
4.5.3 Photochemische Inaktivierung- Riboflavin	62
4.5.4 Lagerung der Stammzellpräparate bei Raumtemperatur vor Kryokonservierung	62
5. ZUSAMMENFASSUNG	64
6. LISTE HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN IN DIESER ARBEIT	65
7. LITERATURVERZEICHNIS	66

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Entwicklung der modernen Stammzelltherapie

Im Jahre 1957 wurde die erste erfolgreiche Knochenmarktransplantation durchgeführt und somit die Grundlage für die Applikation von Hochdosischemotherapien geschaffen.<sup>78)</sup> Vor der Entdeckung zirkulierender Stammzellen im peripheren Blut des Menschen galt das Knochenmark lange Zeit als einzige Quelle für die Gewinnung von Stammzellen für eine Transplantation.

CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen befinden sich im steady state in ca. 10 fach höherer Konzentration im Knochenmark. Nur eine geringe Anzahl zirkuliert in der Peripherie.<sup>7)</sup> Durch die Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie granulocyte-colony-stimulating factor (GCS-F) gelingt es jedoch, sie vermehrt ins periphere Blut auszuschwemmen und in ausreichend hoher Menge, mit der die Durchführung einer Knochenmarktransplantation möglich ist, durch Stammzellapheresen zu sammeln.<sup>18)</sup> Durch die Möglichkeit der Mobilisierung der Stammzellen ins periphere Blut war die Voraussetzung dafür geschaffen, dass sich die periphere Stammzelltransplantation mit ihren Vorteilen, wie

1. des schonenderen Verfahrens im Vergleich zur Knochenmarktransplantation in Vollnarkose und
  2. der möglichen Durchführbarkeit trotz massiver Tumorzellinfiltration des Knochenmarks oder zuvor stattgehabter Irradikation der Beckenregion
- zunehmend neben der Knochenmarktransplantation etablieren und an Bedeutung gewinnen konnte.<sup>31)66)</sup>

### 1.2 Die autologe und die allogene Stammzelltransplantation

Es gibt drei Arten der peripheren Stammzelltransplantation:<sup>56)</sup>

- autolog:  
Spender und Empfänger der Stammzellen sind identisch
- allogene:  
Stammzelltransplantate stammen von genetisch nicht identischen Individuen der selben Spezies (Geschwister/Fremdspender)
- syngene:  
Sonderform, bei der Zellen von einem genetisch identischen Individuum transplantiert werden (eineiiger Zwilling)

Zwei wichtige Kriterien kommen bei der Auswahl eines geeigneten Spenders für eine Stammzelltransplantation zu tragen:<sup>56)</sup>

### 1. Krankheitsbild des Empfängers

Mit den Erfahrungen, die im Laufe der Zeit auf dem Gebiet der Transfusionsmedizin gesammelt wurden, haben sich verschiedene Indikationsbereiche für die unterschiedlichen Arten von Stammzellpräparaten etabliert.

**Tabelle 1.1.** Einfluß des Krankheitsbildes auf die Wahl des Stammzellspenders.<sup>22) 50) 76)</sup>

Spender	Verwendungszweck
autolog, syngen, allogen	Rekonstitution der Hämatopoese nach myeloablativer Therapie bei malignen/nicht malignen hämatologischen/nicht hämatologischen Erkrankungen
allogen, syngen	erworbene Knochenmarkdysfunktionen, SAA
allogen	angeborene hämatopoetische Erkrankungen/Immundefekte

### 2. Verfügbarkeit an Präparaten

Die Versorgung eines Patienten mit einem allogenen Stammzellpräparat kann nicht immer gewährleistet werden. Oft scheidet dies an der Knappheit der zur Verfügung stehenden geeigneten Spender.<sup>56)</sup> Nur 30% der Patienten haben Zugriff auf einen HLA identischen Geschwisterspender, weniger als 1% auf einen syngen Spender, weniger als 5% auf einen HLA-haploidentischen Familienspender und nur für ungefähr 30% der Empfänger läßt sich ein HLA-kompatibler Fremdspender finden.<sup>2)5)</sup>

<sup>7)</sup> Wenn kein geeigneter allogener Spender verfügbar ist, besteht die Möglichkeit, falls es die klinische Situation des Patienten zuläßt, auf die autologe Spende auszuweichen. Bei malignen Erkrankungen mit Infiltration des Knochenmarkes mit Tumorzellen, besteht bei der autologen Spende jedoch die Gefahr der Kontamination des Apheresates mit klonogenen malignen Zellen und damit die Möglichkeit eines erneuten Krankheitsausbruches nach Retransfusion von malignen Zellen.<sup>48)</sup> In so einem Fall kann das Apheresat vor der Transplantation durch Purgung von Tumorzellen gereinigt werden.<sup>15)46)49)</sup>

### 1.3 Anwendungsbereiche der Stammzelltransplantation

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen hat sich bei vielen malignen und nicht malignen Erkrankungen als erfolgreiche Therapiemaßnahme bewährt.<sup>48)</sup>

Tabelle 1.2. und 1.3. listen Einsatzmöglichkeiten der Stammzelltransplantation auf.

**Tabelle 1.2\*** Maligne Erkrankungen, häufigste Indikationen zur Stammzelltransplantation aus Knochenmark oder Blut nach myeloablativer Therapie

Erkrankung	Stadium/Risiko
AML	1.VR (außer bei niedrigem Risiko) 2.VR,PR, beginnendes Rezidiv
ALL	1.VR (Hochrisiko) oder 1.VR t(9;22),t(4;11) 2.VR,PR, beginnendes Rezidiv
CML	Chronische Phase, Akzeleration
MDS	RAEB, RAEB-T, CMMoL
Juvenile CMMoL	Alle
M.Hodgkin	1.PR; Rezidiv nach 7-8 Zytostatika-Kombinationstherapien (außer Spätrezidive)
Hochmaligne NHL	Stadium III, IV: 1.VR (Hochrisiko), PR; 2.VR
Niedrigmaligne NHL	Stadium III, IV: 1.VR, PR; 2.VR
Plasmozytom	Stadium II, III, Hochrisiko
Keimzelltumor, nicht seminomatös	Teilremission; Rezidiv empfindlich auf Chemotherapie
Ewingsarkom	Metastasiert, multilokulär, 2.Vollremission
Mammakarzinom	Stadium II, 10 oder mehr positive Lk: adjuvante Therapie Stadium IV
Ovarialkarzinom	Stadium III und IV

VR: Vollremission; PR: partielle Remission; Rez: Rezidiv; AML: akute myeloische Leukämie; ALL: akute lymphatische Leukämie; CML: chronische myeloische Leukämie; MDS: myelodysplastisches Syndrom; RAEB: refractory anaemia with excess of blasts; RAEB-T: refractory anaemia with excess of blasts in transformation, CMMoL: chronisches myelomonozytäres Lymphom; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; Lk: Lymphknoten

\*originale Tabelle aus: H. Link et al.: die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen-Teil II; Med. Klin. 1997;92:534-545

**Tabelle 1.3\*** Nichtmaligne Erkrankungen, Indikationen zur allogenen Transplantation hämatopoetischer Stammzellen

<b>Erkrankung</b>	<b>Stadium/Risiko</b>
SAA	Alle bis 40 Jahre
PNH	Nach Komplikationen
SCID	Alle
Andere kombinierte Immundefekte	Alle
Juvenile Osteopetrose	Alle
Fanconi-Anämie	Bei Progreß
Neutrophilendefekte. M. Kostman septische Granulomatose	Versager auf G-CSF bzw. auf Infektionsprophylaxe
Homozygote $\beta$ -Thalassämie, Sichelzellanämie	Fakultativ
Angeborene Stoffwechselerkrankungen, Speicherkrankheiten	Fakultativ

SAA: schwere ablastische Anämie; PNH: paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie; SCID: severe combined immune deficiency

\* originale Tabelle aus: H. Link et al.: die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen-Teil II; Med. Klin. 1997;92:534-545

### **Erkrankungen der Hämatopoese und Immundefekterkrankungen**

Bei angeborenen oder erworbenen malignen oder nicht malignen Erkrankungen dieses Formenkreises werden Stammzellen transplantiert, um nach knochenmarkzerstörenden Therapiemaßnahmen (myeloablative Chemotherapie/Ganzkörperbestrahlung) eine Rekonstitution der Hämatopoese und des Immunsystems zu erreichen.<sup>48)</sup> Bei der Transplantation allogener Präparate macht man sich dabei den Graft-versus-Leukämie- bzw. Graft-versus-Tumor-Effekt zu Nutzen.<sup>40)48)</sup> Zunehmend wird die Stammzelltransplantation auch bei Patienten eingesetzt, die von einer signifikanten Einschränkung der Krankheitsprogredienz und einer Verlängerung der Überlebenszeit nach Transplantation profitieren, deren Erkrankung durch die Transplantation jedoch nicht geheilt werden kann. So kommt z.B. die autologe Transplantation bei CML, multiplen Myelom oder bestimmten soliden Tumoren zum Einsatz.<sup>48)</sup>

## **Solide Tumore**

Bei soliden Tumoren ohne Metastasierung und ohne Infiltration des KM wird die periphere Stammzelltransplantation angewandt, wenn trotz Sensitivität auf konventionelle Chemotherapeutika keine Heilung erzielt werden kann. Durch die Stammzelltransplantation ist in solchen Fällen die Option für eine Dosisintensivierung der Zytostatikatherapie in einen weit über der myeloablativen Grenze liegenden Bereich gegeben und damit die intensivere Bekämpfung der maligne entarteten Zellen möglich.<sup>31)65)</sup> Patienten, die an einem Malignom mit Infiltration des KM erkrankt sind, können ebenfalls von einer peripheren Stammzelltransplantation nach HDT profitieren. Je nach Art und Typ des Primärtumors geht man davon aus, dass die Tumorzellkontamination von peripheren Stammzellpräparaten bei Metastasen des KM geringer ist als in den direkt aus dem KM gewonnenen Stammzellpräparaten.<sup>31)</sup>

Am besten untersucht ist bisher der Einsatz der peripheren Stammzelltransplantation bei metastasiertem Mamma-Ca, Neuroblastom bei pädiatrischen Patienten und kleinzelligem Bronchial-Ca mit jedoch sehr unterschiedlichen Erfolgsraten.<sup>38) 47) 65)80)</sup>

## **Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises**

Es wird über den erfolgreichen Einsatz der allogenen Stammzelltransplantation bei Autoimmunerkrankungen wie RA, SLE, MS, Psoriasis, Colitis ulcerosa berichtet.<sup>13) 43) 59) 70)</sup> Ob dieser Erfolg auf die starke Immunsuppression oder die Rekonstitution des Knochenmarks und Immunsystems aus den transplantierten Zellen zurückzuführen ist, ist nicht genau geklärt.<sup>70)</sup>

## **Angeborene Stoffwechselerkrankungen und Speicherkrankheiten**

Durch Transplantation allogener Stammzellen können fehlende lysosomale Enzyme zum Teil durch die transplantierten Zellen substituiert werden. Dabei werden die Enzyme aus den transfundierten Zellen ins Plasma abgegeben und über Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren in Zellen des Empfängerorganismus aufgenommen.<sup>75)</sup>

Dies erklärt Berichte über den erfolgreichen Einsatz der Stammzelltransplantation bei M.Gaucher, M.Hurler und M.Hunter.<sup>33) 45)</sup>

Aufgrund von Weiterentwicklungen im Bereich der Transfusionsmedizin sowie der Anwendung von Breitspektrumantibiotika zur Bekämpfung von Infektionen beim immungeschwächten Transplantatempfänger, ist die Mortalität bei

Stammzelltransplantation zwar rückläufig (<2% bei autologer Stammzelltransplantation)<sup>3)</sup> sie bleibt dennoch eine invasive Therapiemaßnahme, deren Risiken und Komplikationen gründlich gegen ihre Nutzen abgewogen werden müssen.<sup>70)</sup>

#### **1.4 Die Kryokonservierung von Blutstammzellen**

Die Kryopreservation von Stammzellen ist ein weit verbreitetes Verfahren, das das zeitlich unbegrenzte Aufbewahren lebendiger Zellen bis zum Zeitpunkt der Retransfusion zur Rekonstitution der Hämatopoese nach myeloablativer Chemotherapie ermöglicht.<sup>27)</sup> Zum Schutz der Zellen vor beim Einfrieren auftretenden Schäden kommen dabei kryoprotektive Substanzen zum Einsatz. Dimethylsulfoxid in einer Endkonzentration von 10% hat sich in der Praxis bewährt.<sup>72)</sup>  
<sup>73)</sup> 1986 gelang Körbling et al. die erste erfolgreiche Behandlung mit autologen, mittels Leukozytapherese gewonnenen und anschließend kryokonservierten Stammzellen.<sup>42)</sup> Seitdem spielt die Kryokonservierung von Stammzellen eine bedeutende Rolle in der Transfusionsmedizin bei:

- CD34<sup>+</sup> PBPC-rescue nach myeloablativer Chemotherapie
- Zeitlich unbeschränkter Lagerung allogener Stammzellpräparate sowie von Nabelschnur-Stammzellen in sogenannten Stammzellbanken
- Aufbewahrung sogenannter back-up Präparate zur Überwindung der gefährlichen pancytopenischen Phase nach non-take eines bereits transfundierten Transplantats, oder bei Schädigung eines Stammzellpräparates im Rahmen des Purgings
- Verfügbarkeit von Stammzellen für wissenschaftliche Zwecke

#### **1.5 Das Problem der mikrobiellen Kontamination von Stammzellapheresaten**

Infektionen gehören zu den meistgefürchteten Komplikationen in der neutropenischen Phase nach HDT.<sup>60)</sup> <sup>61)</sup> Eine Begleiterscheinung der PBPC-Transplantation nach myeloablativer Therapie, die den Patienten höchst anfällig für Infektionen macht, ist die Phase der Neutropenie, die sich im Mittel über einen Zeitraum von ca. 10 Tagen erstreckt.<sup>41)</sup> Bei Verminderung der Anzahl der Neutrophilen in einen Bereich unterhalb von 500/ $\mu$ l werden regelmäßig Infektionen beobachtet, vor allem bakteriellen Ursprungs. Auch die Anzahl an Patienten, die an einer Sepsis erkranken, nimmt rapide zu.<sup>32)</sup> Die Inzidenz von neutropenischem

Fieber bei Patienten mit PBPC-Transplantation liegt bei über 90%. Bei ca. 50% dieser Patienten bleibt die Genese ungeklärt, bei ca. 48% kann eine Infektion als Ursache nachgewiesen werden. Dominierend sind Bakteriämien (~39%), die in der Mehrzahl der Fälle von Staphylokokken und Streptokokken ausgehen. Seltener isoliert werden die gefährlicheren gramnegativen Keime (*Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, Klebsiellen) und Pilze.<sup>32)41)</sup>

Durch Transfusion von bakteriell kontaminierten Stammzellapheresaten können pathogene Erreger in den abwehrgeschwächten Organismus eindringen und im schlimmsten Fall die Auslösung einer schweren Sepsis nach sich ziehen.<sup>81)</sup> Bei den verschiedenen Schritten, von der Gewinnung des Apheresates bis zu dessen Aufbereitung für die Kryokonservierung und des Auftauens im Warmwasserbad vor der Transfusion, kann es zur mikrobiellen Kontamination der Stammzellen kommen, mit der Folge der Gefährdung des Patienten.<sup>81)</sup> Die Angaben zur Inzidenz mikrobieller Kontamination von PBPC-Apheresaten variieren je nach Studie zwischen 0,5%<sup>58)</sup> und 4,5%.<sup>67)</sup> Die am häufigsten isolierten Erreger bei der Kontamination von Blutprodukten sind.<sup>53)</sup>

- aerobe grampositive Keime der Hautflora wie *Staphylokokkus epidermidis*, *Mikrokokkus spp.*, *Sarcina spp.*, Diphtheroide, wobei Koagulase negative Staphylokokken das Bild dominieren
- sogenannte Umweltkeime wie *Pseudomonas spp.*, *Flavobact. Spp.* Und *Bacillus spp.* Die Pseudomonaden als sogenannte Pfützenkeime spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie oftmals Wasserbäder besiedeln
- gramnegative Stäbchen, die das Zitrat in gelagerten Blutprodukten verstoffwechseln können
- psychrophile Keime, die bei Lagerung der Blutprodukte bei Kühlschranktemperaturen ihre Viabilität nicht einbüßen
- seltener: endogene Erreger, von als zum Zeitpunkt der Blutspende unauffälligen Spendern:
  - bei chronisch latenter Infektion mit *Salmonellen*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*
  - bei akuter transienter Bakteriämie z.B. nach Zahnextraktionen: *Streptokokkus viridans*, *Bacteroides spp.*, *Staphylokokkus aureus*

Tabelle 1.4. listet häufige Erreger bei Kontamination von Stammzellapheresaten auf.

**Tabelle 1.4.\*** Kontaminierende Erreger von Stammzellpräparaten

<b>Spezies</b>	<b><u>Zeitpunkt des Nachweises</u></b> <b>vor Kryokonservierung</b>	<b><u>der positiven Blutkultur</u></b> <b>nach dem Auftauen</b>
<b><u>Grampositiv</u></b>		
Bacillus spp.	0	0
Diphtheroide	4	3
Mikrokokkus spp.	0	2
Peptostreptokokkus	1	1
Propionibacterium	2	6
CNS	6	24
Staph.aureus	0	4
alpha-hämolys. Streptokokken	1	0
<b>Total grampositiv</b>	14	40
<b><u>Gramnegativ</u></b>		
Achromobacter	0	0
Acinetobacter spp.	0	1
Enterobacter agglomerans	1	0
Enterobacter cloacae	1	0
Klebsiella pneumoniae	1	0
Moraxelle nonliquifaciens	1	0
Pseudomonas cepacia	0	2
Pseudomonas maltophilia	0	1
Pseudomonas paucimobilis	3	4
Pseudomonas picketti	0	2
Pseudomonas spp.(nicht P.aeruginosa)	0	1
Sphingobacterium multivorum	0	2
Unidentifizierte Bazillen	0	1
<b>Total gramnegativ</b>	7	14
Gemischte Flora und nicht identifizierte Keime	1	1
<b><u>Hefen</u></b>	1	0
Gesamtzahl kultivierter Organismen	23	55
Anzahl als positiv befundeter Komponenten	23	42

\*modifizierte Tabelle aus: I.J. Webb, F.S. Coral, J.W. Andersen, A.D. Elias, R.W. Finberg, L.M. Nadler, J. Ritz, K.C. Anderson. Sources and sequela of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components : implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. Transfusion 1996; 36:782-788

Die häufigsten Vertreter bei Kontamination von Blutprodukten sind demnach gram-positive Erreger, v.a. Keime der Hautflora, wie *Staphylokokkus epidermidis*, wobei die schwerstwiegenden Folgen bei Kontamination mit gramnegativen Keimen und psychrophilen Mikroorganismen, die auch bei Kühlschranktemperaturen von 4-5°C gut gedeihen können, bekannt sind.<sup>74)</sup> Selbst wenn bei manchen Studien von zu vernachlässigenden Konsequenzen bei Transfusion kontaminierter Apheresate die Rede ist<sup>67)</sup>, so sind doch Fälle nachgewiesen, mit ernstem und sogar tödlichem Ausgang im Zusammenhang mit der Transfusion von kontaminierten Blutprodukten.<sup>8)</sup> Die klinischen Folgen der Transfusion eines bakteriell kontaminierten Apheresates können sehr mannigfaltig sein und reichen von unspezifischen Symptomen wie Fieber und Schüttelfrost bis hin zu Zeichen des septischen Schocks. Man kann davon ausgehen, dass die Zahl der transfusion-assoziierten Sepsis als zu niedrig eingestuft wird, da viele der Transfusionszwischenfälle, wegen ihrer anfangs sehr unspezifischen Symptomatik, nicht als solche erkannt werden oder als hämolytische Reaktion, bzw. unspezifisches Fieber mißinterpretiert werden.<sup>54)</sup>

### **1.6 Ziel der vorliegenden Studie**

Beim zum Zeitpunkt der PBPC-Spende gesund erscheinenden autologen Spender erhöhen invasive diagnostische und therapeutische Maßnahmen die Gefahr einer asymptomatischen Bakteriämie.<sup>30)</sup> Die Kontaminationsgefahr von autologen PBPC-Apheresaten mit Mikroorganismen ist insgesamt viel höher einzuschätzen als bei einer elektiven allogenen Spende und die Keimfreiheit eines Apheresates kann niemals zu 100% gewährleistet werden.

Wenn trotz aller Vorsichtsmaßnahmen eine mikrobielle Kontamination eines Aphereseproduktes aufgetreten ist, kann die Transfusion dieses Zellkonzentrates schwerwiegende Folgen für den neutropenischen Transplantatempfänger nach sich ziehen. Aus diesem Grund muß oftmals eine Wiederholung der Zellgewinnung angestrebt werden. Diese ist mit erheblichen Nachteilen verbunden, denn sie bedeutet für den Patienten nicht nur eine erneute Belastung und einen zeitlichen Aufschub der Therapie, sondern evtl. auch die Notwendigkeit einer erneuten Stammzellmobilisierung und damit eine wiederholte Konfrontation mit all den Risiken, Nebenwirkungen und Komplikationen der gesamten Prozedur. Bei einer wiederholten Apherese ist zudem der Zeitpunkt zur Gewinnung eines Apheresates mit optimaler Anreicherung der Zielpopulation bereits verstrichen da die Knochenmarkreserve bereits erschöpft ist, weshalb oftmals ein nur minderwertiges Zellprodukt gewonnen

werden kann. Zu guter Letzt dürfen auch die Kostspieligkeit und der Zeitaufwand des Verfahrens nicht vernachlässigt werden.

Die Inaktivierung von Erregern in einem mikrobiell kontaminierten Apheresat mit der nachträglichen Erzielung der Keimfreiheit, wäre eine Möglichkeit das Apheresat zu retten und eine Wiederholung der Zytapherese mit all ihren Nachteilen zu umgehen.

Es ist bekannt, dass bestimmte Keime höchst empfindlich auf eine Absenkung der Temperatur unter 37°C reagieren<sup>17)</sup>, während wiederum einige gramnegative Mikroorganismen (*Flavobact. spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Yersinia enterocolitica*) bei Kühlschranktemperaturen sich gut vermehren können<sup>53)62)67) 74)</sup>, was bei grampositiven Erregern kaum zu beobachten ist.<sup>67)</sup> Andererseits liegen Berichte über die Isolation von lebendigen Keimen (*Bacillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Corynebakterien*, *Pseudomonas aeruginosa*, *CNS*, *Aspergillus*) aus tiefgekühlten Flüssig-Stickstoff-Behältern vor.<sup>23)</sup>

Im Rahmen dieser Studie sollte deshalb untersucht werden, inwieweit die Kryokonservierung einen klinisch zuverlässigen bakteriziden Effekt auf Erreger in kontaminierten Zellprodukten aufweist.

Unser besonderes Interesse galt bei dieser Fragestellung den klinisch relevanten, am häufigsten vorkommenden und gefährlichen Keimen bei der Kontamination von Apheresaten.

Zu diesem Zweck wurden Proben aus 24 autologen MNC-Apheresaten fraktioniert, gezielt mit nach bestimmten Kriterien ausgewählten Mikroorganismen kontaminiert und auf das Überleben der Keime in den Proben unter den Vorgängen der Kryokonservierung und des Wiederauftauens untersucht.

## **2. Methodik**

### **2.1 Studiendesign**

Die Studie wurde als kontrollierte prospektive klinisch-experimentelle Untersuchung angelegt. Untersucht wurden 24 MNC-Apheresate von 24 freiwilligen gesunden Spendern, die gezielt mit ausgewählten Mikroorganismen kontaminiert wurden. Ein Teil der kontaminierten Apheresate wurde kryokonserviert und nach dem Auftauen auf Überleben der Keime in den Proben untersucht.

### **2.2 Auswahl der Spender**

#### **2.2.1 Ethik**

Im Rahmen einer internen Qualitätskontrolle der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Großhadern zur Untersuchung der mikrobiellen Kontaminationsrate von Apheresaten wurden nach Inkenntnissetzung des Kontrollleiters der Studie MNC-Apheresen bei gezielten Spenden von freiwilligen gesunden Spendern gewonnen.

Die Auswahl der Spender fand statt, nachdem anhand der Ein- und Ausschlußkriterien die Eignung zur Aufnahme in die Studie gesichert wurde.

Die MNC-Apheresen wurden nur dann durchgeführt, wenn der Spender nach ausführlicher Aufklärung über das Verfahren, mögliche Risiken und Nebenwirkungen und den genauen Verwendungszweck der gespendeten Zellen durch einen Arzt, schriftlich seine Einwilligung zur Durchführung der Apherese gab.

Die Apheresen wurden ohne vorhergehende Immunisierung der Spender durchgeführt. Um den Eingriff für den Spender so wenig belastend wie möglich zu gestalten verkürzten wir die Dauer der MNC-Gewinnung auf maximal 60 Minuten - im Vergleich zur normalen Stammzellapherese, die oftmals einen Zeitraum von 3-5 Stunden beansprucht. Die Spender waren während ihres Einsatzes wie die anderen Spender der Abteilung voll versichert.

#### **2.2.2 Einschlußkriterien**

Bei der Feststellung der Spendetauglichkeit galten die Ein- und Ausschlußkriterien der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten.<sup>12)</sup>

- Alter: 18-60 Jahre
- Geschlecht: männlich oder weiblich

- Gewicht: >50kg
- geeignete Venenverhältnisse
- keine pathologischen Laborbefunde
- freiwillige Teilnahme

### 2.2.3 Ausschlußkriterien

- akute/chronische Organ- bzw. Systemerkrankung
- positive Allergianamnese
- fieberhafte Erkrankung und/oder Durchfallerkrankung
- bestehende/mögliche Schwangerschaft
- regelmäßige Medikamenteneinnahme (Anithypertensiva, blutgerinnungshemmende Medikamente, Schmerzmittel, Cortisonpräparate, Schlafmittel, Abführmittel, orale Kontrazeptiva)

### 2.2.4 Zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen

Alle der im Rahmen der Studie anfallenden Patientendaten unterliegen dem Datenschutz. Bei Arbeitsschritten mit potentiell infektiösem Material wurde mit besonderer Vorkehr und in einem eigens dafür vorgesehenen Raum gearbeitet. Es wurde streng darauf geachtet, dass keine unbeabsichtigte Kontamination von Dingen, die im Rahmen des klinischen Alltags genutzt werden, stattfindet. Daher wurde für die Kryokonservierung auch nicht das Controlled-rate freezing Gerät der Abteilung verwendet, sondern mit einem für den Versuch entwickelten Einfriermodell gearbeitet, das das controlled-rate freezing imitieren sollte.

## 2.3 Auswahl der Mikroorganismen

### 2.3.1 Auswahlkriterien

In die Studie aufgenommen wurden Keime, die unter einen der folgenden Gesichtspunkte fielen:

- häufig isolierte Keime bei blutprodukt-assoziiertes Sepsis<sup>9) 54)</sup>
- Typische Kontaminationskeime von Stammzellpräparaten<sup>58)67) 81)</sup>
- Mikroorganismen deren Kontamination von Blutprodukten besonders schwerwiegende Folgen für den Empfänger nach sich ziehen: gramnegative Erreger<sup>8)</sup>, nosokomiale Keime<sup>37)</sup> sowie psychrophile Mikroorganismen<sup>53)67)</sup>
- Erreger mit bekannter Kältesensibilität<sup>17)</sup>

- Keime, die häufig bei Infektionen in der neutropenischen Phase bei Empfängern von Stammzellpräparaten isoliert werden<sup>41) 63) 79)</sup>

### **2.3.2 Verwendete Keime**

Nach sorgfältiger Überprüfung der Erfüllung mindestens eines der Auswahlkriterien zur Aufnahme des Keimes in die Studie, wurden fünf Erreger für die gezielte Kontamination der MNC-Apheresate ausgewählt: Koagulase-negative Staphylokokken, *Staphylokokkus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*. Für die Versuche verwendet wurden ATCC-Stämme (trademark American Type Culture Collection, made in USA) aus dem Labor der Mikrobiologie des Universitätsklinikums Großhadern.

#### **2.3.2.1 Staphylokokkus aureus**

0,8-1,0µm große, grampositive, unbewegliche, sporenlose fakultativ anaerobe Bakterien mit hämolysierendem Verhalten. Relative Salz- und Hitzeresistenz ist bekannt. Staphylokokken sind unter anderem wichtige Erreger von Hospitalinfektionen. Gefährlich sind Penicillin- und Methazillinresistenzen.

#### **2.3.2.2 Koagulase-negative Staphylokokken**

Dominierender Erreger bei der Kontamination von Stammzellapheresaten.<sup>58)67) 81)</sup> CNS besitzen die allgemeinen Eigenschaften der Staphylokokken, zeichnen sich jedoch durch das Fehlen der Plasmakoagulase aus. Im Gegensatz zu *Staph.aureus* sind sie Bestandteil der normalen Hautflora. Wegen ihrer Fähigkeit zur Besiedelung von Plastikoberflächen haben sie große Bedeutung als Erreger nosokomialer Infektionen erlangt.

#### **2.3.2.3 Escherichia coli**

Gramnegatives, sporenloses, oft bewegliches Stäbchen aus der Familie der Enterobacteriaceae. Wegen der häufigen Plasmidaustausche innerhalb der Enterobacteriaceae, kommen Mehrfachresistenzen gegen Chemotherapeutika und Desinfektionslösungen gehäuft vor, was die steigende Bedeutung von *E.coli* als Erreger nosokomialer Infektionen erklärt.

#### **2.3.2.4 Pseudomonas aeruginosa**

Pseudomonaden sind obligat aerobe, gramnegative, nicht fermentierende, sporenlose bewegliche Stäbchen mit minimalen Wachstumsansprüchen. Sie zeigen

optimales Wachstum bei 37°C und 42°C, wachsen aber nicht bei Kühlschranktemperaturen von 4°C.<sup>62)</sup> Pseudomonaden werden auch als „Pfützenkeime“ bezeichnet, da sie in der Umwelt, vor allem aber an feuchten Standorten weit verbreitet sind. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die natürliche Resistenz der Pseudomonaden gegen eine Vielzahl von klassischen Antibiotika und Desinfektionsmitteln. Durch Besiedelung von Warmwasserbädern spielen Pseudomonaden beim Auftauen kryokonservierter Apheresate eine bedeutende Rolle als potentieller Kontaminationskeim.<sup>81)</sup>

### **2.3.2.5 Candida albicans**

Grampositiver Sproßpilz. Als Bestandteil der Normalflora menschlicher Schleimhäute ist er ein wichtiger Erreger opportunistischer Infektionen beim immunsupprimierten Patienten. Besonders gefürchtet wegen ihrer schweren Komplikationen ist die sogenannte Soorsepsis, eine generalisierte Infektion mit Candida bei Abwehrgeschwächten.

### **2.3.3 Yersinia enterocolitica**

Nicht zur gezielten Kontamination verwendet wurde *Yersinia enterocolitica*, einer der Haupterreger bei der Kontamination von Blutprodukten.<sup>53)</sup> *Yersinia enterocolitica* ist ein psychrophiler Keim, der bei Kühlschranktemperaturen optimale Wachstumsbedingungen entwickelt und Zitrat in gelagerten Blutprodukten verstoffwechseln kann. Wegen seines Mangels an Siderophoren zum Transport von Eisen ist *Yersinia enterocolitica* auf externe Eisenzufuhr angewiesen, weshalb Konzentrate mit eisenhaltigen Erythrozyten ein optimales Medium sind.<sup>53)14)</sup> Da bei dieser Studie aber mit MNC-Konzentraten gearbeitet wurde, sollte *Yersinia enterocolitica*, als erythrozytophiler Keim, nicht zur gezielten Kontamination verwendet werden.

## **2.4 MNC-Gewinnung**

### **2.4.1 Venöse Zugänge**

Nach Desinfektion der Punktionsstelle mit 70%igem Alkohol wurden jedem Spender zwei venöse Zugänge gelegt. An einem Arm für den Zufluß des Blutes zum Zellseparator eine 16G-Kanüle und am anderen Arm für den Rückfluß eine 19G-Kanüle. Dabei wurden bei guten Venenverhältnissen bevorzugt die Vena basilica oder die Vena cephalica in der Fossa cubitalis punktiert.

### **2.4.2 Antikoagulation**

Die Blutgerinnungshemmung während der Apherese wurde mit Zitratlösung, ACD-A der Firma Baxter, durchgeführt. Zitrationen komplexieren freies Kalzium im Blut und entziehen diese kalziumabhängigen Schritten der Gerinnungskaskade.

### **2.4.3 Zytapherese**

Die Apherese zur Gewinnung der MNC wurden an einem Zellseparator, Typ COBE Spectra (Cobe BCT, Inc., Lakewood, CO) der Seriennummer 2 mit dem Programm MNC durchgeführt. Dabei verwendeten wir das WBC-Schlauchset von Cobe. Nach Eingabe von Größe, Gewicht und Hämatokrit des Spenders wurde die Apherese automatisch durch das Gerät gesteuert, wobei ein manuelles Eingreifen und Korrekturen jederzeit möglich blieben. Nach Zentrifugation wurde unter optischer Kontrolle die Fraktion der MNC eingestellt und kontinuierlich in den externen Sammelbeutel abgepumpt. Die restlichen Blutbestandteile wurden dem Spender über den Rückfluß reinfundiert.

### **2.4.4 Nebenwirkungen**

Bei den geringsten Anzeichen einer Hypokalzämie beim Spender (Parästhesien perioral/akral) wurde oral Kalzium substituiert. Bei keiner der Apheresen kam es jedoch zu schwereren Zwischenfällen, bei denen entweder eine intravenöse Kalziumgabe oder weitere Behandlungsmaßnahmen notwendig geworden wären.

### **2.4.5 Abbruchkriterien**

Bei dem geringsten Anhalt für eine gesundheitliche Beeinträchtigung des Spenders während der Apherese, Äußerung des Spenders über subjektives Mißbefinden, Kreislaufregulationsstörungen oder dem Auftreten von schweren Nebenwirkungen sollte die Apherese abgebrochen werden.

## **2.5 Klinische Befunde**

### **2.5.1 Anamnese**

Die Anamnese wurde mit dem Aufnahmebogen für Patienten/Spender zur Zytapherese der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Großhadern erfaßt.

### **2.5.2 Körperliche Untersuchung**

Jeder Versuchsteilnehmer durchlief vor der Spende eine körperliche Untersuchung durch einen Arzt.

### **2.6 Meßgrößen**

Bei jedem Spender wurden folgende Parameter bestimmt:

- Differentialblutbild vor und nach der Apherese
- C-reaktives Protein
- Infektionsserologie zur Dokumentation des Infektionsstatus des Spenders zum Zeitpunkt der Zytapherese
- Differentialblutbild des Apheresates als Qualitätskontrolle für das gewonnene MNC-Konzentrat

Dabei wurde die Bestimmung des Diff-BB an einem Counter-Gerät (Sysmex KX21, Sysmex GmbH, BRD) vorgenommen. Das CRP wurde in dem Labor für klinische Chemie des Klinikums bestimmt und die Überprüfung der Infektionsserologie erfolgte abteilungsintern im Labor der Abteilung für Transfusionsmedizin.

### **2.7 Kontamination des MNC-Konzentrats**

Zur gezielten Kontamination des Apheresates wurde jeweils 1ml Bakteriensuspension in der gewünschten Verdünnungsstufe verwendet.

### **2.8 Kryokonservierung**

Dem gekühlten Apheresat wurde niedermolekulares Kryoprotektiv (DMSO reinst, SERVA Electrophoresis GmbH, BRD) in einer Trägerlösung aus RPMI (RPMI 1640 Medium, GIBCO BRL, Life technologies, Scotland) zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 10% DMSO im Apheresat erlangt wurde. Alle Arbeitsschritte des Einfriermodells geschahen dabei auf Eis, um die zytotoxische Wirkung von DMSO bei Raumtemperatur aufzuheben. Anschließend wurden die Proben in eine mit Isopropanol (2-Propanol reinst, Merck KgaA, BRD) gefüllte Box gelagert und für 1<sup>1/2</sup> Stunden in einem –80°C Trockenkühler (Colora UF 85-460T, Colora Messtechnik GmbH; Lorch/Württ.) gestellt. Durch das, das Apheresat ummantelnde Isopropanol sollte dabei ein Abkühlen der Proben um ca. 1°C/min gewährleistet werden. Schließlich wurden die Proben in Flüssigstickstoff gebracht.

## **2.9 Auftauen**

Das Auftauen der MNC geschah möglichst rasch in einem Wasserbad von 37°C.

## **2.10 Beimpfen der Kulturfläschchen**

Zum Anfertigen der Kulturen verwendeten wir BACTEC™PLUS Aerobic/F\* und PLUS Anaerobic/F\* Kulturfläschchen, PP-099C, mit Casein-Soja-Pepton-Bouillon von Becton Dickinson and Company, USA. Nach Desinfektion der Einstichstelle wurden jeweils eine aerobe und eine anaerobe Flasche mit dem Apheresat beimpft und nach Lagerung im Brutschrank bei 37°C für 24 Stunden zur Untersuchung in die Mikrobiologie eingesandt.

## **2.11 Weiterverarbeitung in der Mikrobiologie**

Im Labor der Mikrobiologie wurden die angefertigten Blutkulturen mit dem vollautomatischen BACTEC 9240 Gerät von BECTON DICKINSON, USA, auf die Kontamination mit lebensfähigen Mikroorganismen überprüft. Ein Sensor mißt dabei das als Stoffwechselprodukt der Bakterien anfallende CO<sub>2</sub> , zeichnet eine Wachstumskurve auf und befundet die Kultur als positiv. Zur Bestätigung der Ergebnisse, sowie zur Isolierung und genauen Identifizierung der Keime wurden zusätzlich Subkulturen auf Agarnährböden angefertigt.

## **2.12 Versuchsablauf**

Vor der Bearbeitung der Hauptfragestellung dieser Studie stellten sich zwei wichtige Phasen der Vorbereitung.

### **2.12.1 Vorversuch zur Erzielung korrekter Keimzahlen bei der Herstellung unterschiedlicher Verdünnungsstufen von Keimsuspensionen**

#### **Ziel des Vorversuches**

Bakteriensuspensionen sollten, für die spätere Kontamination des Apheresates im Hauptversuch, in Verdünnungsstufen hergestellt werden, die quantitativ objektivierbar auch der darin angestrebten Keimzahl entsprechen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der einzelnen Bakteriensuspensionen hergestellt, mit den Verdünnungsstufen 10<sup>-2</sup>-10<sup>7</sup>, und Kontrollausstriche einzelner Verdünnungsstufen auf Agarplatten angefertigt. Nach Bebrüten der Nährbodenplatten für 24 Stunden bei 37°C in einem Brutschrank wurde die Zahl koloniebildender Einheiten (KBE)

bestimmt und mit der angestrebten Keimzahl in dieser Verdünnungsstufe verglichen. Bei der Herstellung der Verdünnungsstufen wurde mit unterschiedlichen optischen Dichten (OD) am Digitalphotometer gearbeitet, um so die OD für jeden Keim herauszufiltern, bei der die genauesten Verdünnungskonzentrationen erzielt werden können.

Im Labor für Mikrobiologie des Klinikums:

- **Herstellung der Bakteriensuspensionen**

In ein mit sterilem NaCl gefülltes NUNC-Röhrchen (NUNC™, Brand Products, Nalge Nunc International, NUNC GmbH & Co) wurde jeweils etwas Erregermaterial von einer fraktioniert beimpften Agarplatte eingebracht und gut vermischt bis eine homogene Bakteriensuspension entstanden war.

- **Einstellung der optischen Dichten am Digitalphotometer**

Anschließend wurde das Digitalphotometer 6114S (Eppendorf, BRD) bei eingelegtem 546nm-Filter mit einer Probe mit sterilem NaCl auf Null justiert und schließlich tropfenweise Bakteriensuspension zupipetiert bis die digitale Anzeige des Photometers die erwünschte OD anzeigte. Solange die erwünschte OD noch nicht erreicht war, wurde bei zu niedrigem Wert noch mehr Suspension zupipetiert, bei zu hoher OD mit NaCl verdünnt, bis sich der Zielwert einstellte.

- **Herstellung der Verdünnungsreihen**

In Glasröhrchen wurden mit einer Eppendorfpipette jeweils 0,9ml NaCl vorgelegt. Anschließend wurden 100µl der hergestellten Bakteriensuspension mit der jeweiligen OD in das erste Glasröhrchen, das die Verdünnungsstufe  $10^7$  enthalten sollte, zupipetiert, so dass in diesem Röhrchen ein Gemisch Bakteriensuspension zu sterilem NaCl im Verhältnis 1:9 entstand. Als nächster Schritt erfolgte nach gutem Durchmischen das jeweilige Überpipetieren von 100µl in das darauffolgende Röhrchen (1. In 2. Röhrchen, 2. In 3. Röhrchen, 3. in 4. Röhrchen, usw.) so dass letztendlich eine Verdünnungsreihe mit abfallenden Verdünnungsstufen von  $10^7$  im ersten Röhrchen bis zu  $10^{-2}$  im letzten Röhrchen entstand.

- **Anfertigung der Qualitätskontrolle**

Von den hergestellten Verdünnungsstufen der Bakterien wurden 100µl auf Blutagarplatten, bei *Candida albicans* 100µl auf Sabouraudagar pipetiert und anschließend mit einem sterilen Metallspatel gleichmäßig auf dem Nährboden verteilt. Nach Bebrüten der Platten in einem Brutschrank (Bakterien 24 Stunden, *Candida albicans* 48 Stunden) bei 37°C wurden die Anzahl KBE pro Agarplatte ausgezählt, um so auf die anfangs in der Bakteriensuspension vorhandene Keimzahl rückschließen zu können und zu beurteilen, mit welcher eingestellten OD für die einzelnen Keime die Verdünnungskonzentrationen möglichst genau erreicht werden können.

### **2.12.2 Pilotstudie zur Bestimmung der Keimnachweisgrenzen der Erreger im Apheresat**

#### **Ziel der Pilotstudie**

Um herauszufinden, welches minimale Inokulationsvolumen für den sicheren Nachweis einer bakteriellen Kontamination, mit sepsisähnlichen Anzahlen KBE in der Blutkultur, unabdingbar ist, wurde eine Phase der Pilotstudie durchgeführt.

Zu diesem Zweck führten wir 15 gezielte MNC-Apheresen an 15 freiwilligen gesunden Spendern durch, die nach sorgfältiger Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien für die Studie zugelassen waren. Zehn der Spender waren weiblich, fünf männlich. Das Alter der Versuchsteilnehmer reichte von 19 bis zu 46 Jahren (mittleres Alter 28 Jahre). Pro Apherese wurde mit einem der Erreger in verschiedenen Verdünnungsstufen gearbeitet ( $10^{-2}$ - $10^7$ ), mit dem die Positivkontrollen gezielt kontaminiert wurden. Als Sterilitätskriterium diente im Versuchsansatz die Negativkontrolle. Jeder Keim durchlief die Pilotstudie insgesamt drei mal.

Im Zentrum für Transfusionsmedizin:

- Auswahl der Spender gemäß der Ein- und Ausschlusskriterien
- Ärztliche Untersuchung der ausgewählten Spender:
  - Anamnese mit dem Aufnahmebogen für Patienten/Spender zur Zytapherese der Abteilung
  - körperliche Untersuchung

- Aufklärung über Ziel, Ablauf und Risiken der Studie mit Unterschrift des Spenders auf der Einverständniserklärung zur Sicherung der freiwilligen Teilnahme
- MNC-Apherese

Im Sterilraum:

- Portionierung des Apheresates

Im Labor für Mikrobiologie:

- Herstellung der Verdünnungsreihe der Keimsuspension
- Anfertigung der Kontrollausstriche von den Verdünnungsstufen  $10^2$ - $10^4$

Im Kontaminationsraum:

- Kontamination des Apheresates mit 1ml der gewünschten Verdünnungsstufe der Keimsuspension
- Beimpfen der Kulturfläschchen

In der Mikrobiologie:

- Untersuchung der eingesandten Kulturen

### **2.12.3 Hauptstudie mit Kryokonservierung des gezielt bakteriell kontaminierten Apheresates**

Für die Hauptstudie wurden 24 gezielte MNC-Spenden an 24 freiwilligen gesunden Spendern, 12 davon weiblich, 12 männlich, im Alter von 19-53 Jahren (mittleres Alter von 30 Jahren) durchgeführt. Das Konzentrat wurde mit den Erregern in einer ausgewählten Verdünnungsstufe kontaminiert, anschließend kryokonserviert und schließlich auf Überleben der Keime in den Proben untersucht. Dabei wurde zur Gewinnung der MNC und bei der Herstellung der Keimsuspensionen wie oben vorgegangen. Einige zusätzliche Arbeitsschritte waren für die Kryokonservierung notwendig.

Im Kontaminationsraum:

- Kontamination des Apheresates
- Herstellung der kryoprotektiven Lösung
- Zugabe der kryoprotektiven Lösung zum Apheresat
- Lagerung der Proben in einer Isopropanol-Box

Im Kühlraum der Abteilung für Transfusionsmedizin:

- Lagerung der Box in den  $-80^{\circ}\text{C}$  Trockenkühlschrank
- Nach  $1^{1/2}$  Stunden Umlagerung in einen Flüssig-Stickstoff-Behälter

Im Kontaminationsraum:

- Auftauen der Proben in einem Warmwasserbad mit  $37^{\circ}\text{C}$
- Anfertigen der Kulturen für die Mikrobiologie

### 2.13 Dokumentation

In das Protokoll jedes Versuches wurden aufgenommen:

- Anamnesebogen, mit Befund der körperlichen Untersuchung
- Aufklärungsbogen mit Einverständniserklärung des Spenders
- Protokoll der Zytapherese
- Befunde der Blutuntersuchung
- Mikrobiologische Befunde der angefertigten Kulturen

### 2.14 Auswertung

Für die Daten der Spender der Pilot- und Hauptstudie wurden die wichtigsten Lokalisationsmaße der deskriptiven Statistik berechnet:

- der arithmetische Mittelwert  $\bar{x}$
- die Standardabweichung SD
- der Median MA
- und die Spannweite R mit Angabe des maximalen  $x_{\max}$  und minimalen  $x_{\min}$  gemessenen Wertes.

Alter, Größe, Gewicht: Da die reale Verteilungsfunktion der Daten nicht bekannt war und keine Transformation dieser Werte in eine Normalverteilung möglich war, kamen hier nichtparametrische Tests zur Anwendung. Beim Vergleich zweier unabhängiger Stichproben verwendeten wir den U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon.

Blutbildparameter: beim Vergleich zweier abhängiger normalverteilter Stichproben setzten wir den t-Test für verbundene Stichproben, bzw. bei nicht normalverteilten Stichproben den Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ein. Das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert von 0,05 festgelegt. Wo ein kausaler Zusammenhang zwischen Variablen zu vermuten war, wurde der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient bestimmt. Dichotome Zielgrößen wurden in Vierfeldertafeln dargestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Spender

##### 3.1.1 Morphometrische Daten

Unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden 15 freiwillige gesunde Spender beiderlei Geschlechts für die Pilotstudie und 24 freiwillige gesunde Spender für die Hauptstudie aufgenommen. Das Geschlecht und die morphometrischen Daten der Spender sind in Tabelle 3.1 und 3.2 zusammengefaßt.

**Tabelle 3.1.** Geschlecht und morphometrische Daten der Spender für die Pilotstudie

Spender	Geschlecht	Alter [aa]	Größe [cm]	Gewicht [kg]
1 LS	w	22	158	50
2 BA	w	23	163	56
3 KÖ	m	37	168	80
4 GC	w	46	160	59
5 EE	m	34	187	100
6 HI	w	32	158	53
7 SL	w	20	164	57
8 SK	w	46	164	90
9 MP	w	25	175	65
10 SW	w	23	164	50
11 SA	w	19	149	56
12 KiA	m	24	180	78
13 BIA	w	23	160	50
14 SC	m	23	192	95
15 StM	m	24	188	88
x		28,07	168,67	68,47
SD		8,88	12,78	18,07
MA		24,00	164,00	59,00
R		27,00	43,00	50,00
x <sub>min</sub>		19,00	149,00	50,00
x <sub>max</sub>		46,00	192,00	100,00
p(Mann-Whitney Rank Sum Test)		0,564	0,214	0,644

**Tabelle 3.2.** Geschlecht und morphometrische Daten der Spender für die Hauptstudie

Spender	Geschlecht	Alter [aa]	Größe [cm]	Gewicht [kg]
1 WA	w	53	167	80
2 BD	m	23	180	80
3 KD	w	49	165	72
4 SK	w	46	164	90
5 LS	w	23	156	51
6 KiA	m	24	180	78
7 SC	m	23	192	95
8 BA	w	23	162	56
9 StM	m	24	188	88
10 SW	w	23	164	50
11 WL	m	50	185	72
12 TD	w	26	168	58
13 CM	m	25	180	70
14 SA	w	19	148	56
15 BS	m	24	189	74
16 BIA	w	23	160	50
17 GV	w	24	175	65
18 KA	w	23	165	53
19 TR	m	23	180	73
20 KM	m	33	169	75
21 KI	w	39	170	58
22 KÖ	m	38	168	84
23 SM	m	30	172	80
24 WR	m	22	185	86
x		29,58	172,17	70,58
SD		10,34	11,27	13,78
MA		24,00	169,50	72,50
R		34,00	44,00	45,00
x <sub>min</sub>		19,00	148,00	50,00
x <sub>max</sub>		53,00	192,00	95,00

Kein Spender, der an der Studie teilnahm, war jünger als 19 Jahre oder älter als 53. Das mittlere Alter der Spender für die Hauptstudie war 29,58 $\pm$ 10,34 Jahre, für die Pilotstudie 28,07 $\pm$ 8,88 Jahre. Die mittlere Körpergröße betrug bei den Spendern der Hauptstudie 168,67 $\pm$ 12,78cm, das mittlere Körpergewicht 68,47 $\pm$ 18,07kg. Bei den Spendern der Pilotstudie war die mittlere Körpergröße 168,67 $\pm$ 12,78cm und das mittlere Körpergewicht 68,47 $\pm$ 18,07kg.

**Tabelle 3.3.** Vierfeldertafel zur Darstellung der Geschlechtsverteilung in beiden Spendergruppen

Spender der	Geschlechtsverteilung	
	männlich	weiblich
Hauptstudie	12	12
Pilotstudie	5	10

Zwischen beiden Spendergruppen zeigte sich hinsichtlich des Alters, der Größe, des Gewichts (im Mann-Whitney Rank Sum Test) und der Geschlechtsverteilung (im Chi<sup>2</sup>-Test) keine signifikanten Unterschiede.

### 3.1.2 Blutbildparameter

Tabelle 3.4 und 3.5 und die Abbildungen 3.1-3.6 zeigen Veränderungen der Anzahl roter Blutkörperchen, des Hämoglobins und des Hämatokrits der Spender vor und nach der Zytapherese.

**Tabelle 3.4.** Einfluß der Zytapherese auf Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit der Spender der Pilotstudie

Spender	RBC <sub>vorher</sub> x10 <sup>6</sup> /µl	RBC <sub>nachher</sub> x10 <sup>6</sup> /µl	HGB <sub>vorher</sub> [g/dl]	HGB <sub>nachher</sub> [g/dl]	HCT <sub>vorher</sub> %	HCT <sub>nachher</sub> %
1 LS	4,79	4,21	14,00	12,10	40,40	35,50
2 BA	4,28	4,34	12,50	12,70	37,90	38,40
3 KÖ	5,16	4,78	14,60	13,80	42,70	39,30
4 GC	4,54	4,18	13,10	12,50	39,80	36,50
5 EE	5,05	4,65	14,70	13,50	44,00	40,40
6 HI	4,54	4,00	14,10	12,70	41,40	36,70
7 SL	4,27	3,99	13,40	12,50	40,10	37,30
8 SK	4,21	4,04	13,10	12,10	38,00	36,80
9 MP	4,02	3,55	12,00	10,60	35,10	31,20
10 SW	4,60	4,24	13,70	12,30	39,00	35,90
11 SA	4,55	4,07	14,00	12,50	40,60	36,50
12 KiA	5,11	4,62	14,20	12,70	41,30	37,10
13 BIA	5,00	4,10	14,70	12,30	44,70	36,60
14 SC	4,99	4,75	14,90	14,30	44,00	37,10
15 StM	4,65	4,12	14,10	13,70	41,00	38,30
x	4,65	4,24	13,81	12,69	40,67	36,91
SD	0,36	0,34	0,84	0,89	2,58	2,04
MA	4,60	4,18	14,00	12,50	40,60	36,80
R	1,14	1,23	2,90	3,70	9,60	9,20
x <sub>min</sub>	4,02	3,55	12,00	10,60	35,10	31,20
x <sub>max</sub>	5,16	4,78	14,90	14,30	44,70	40,40
p(t-Test)	< 0,001		< 0,001		< 0,001	

Abb.3.1. Einfluß der Zytapherese auf RBC bei Spendern der Pilotstudie

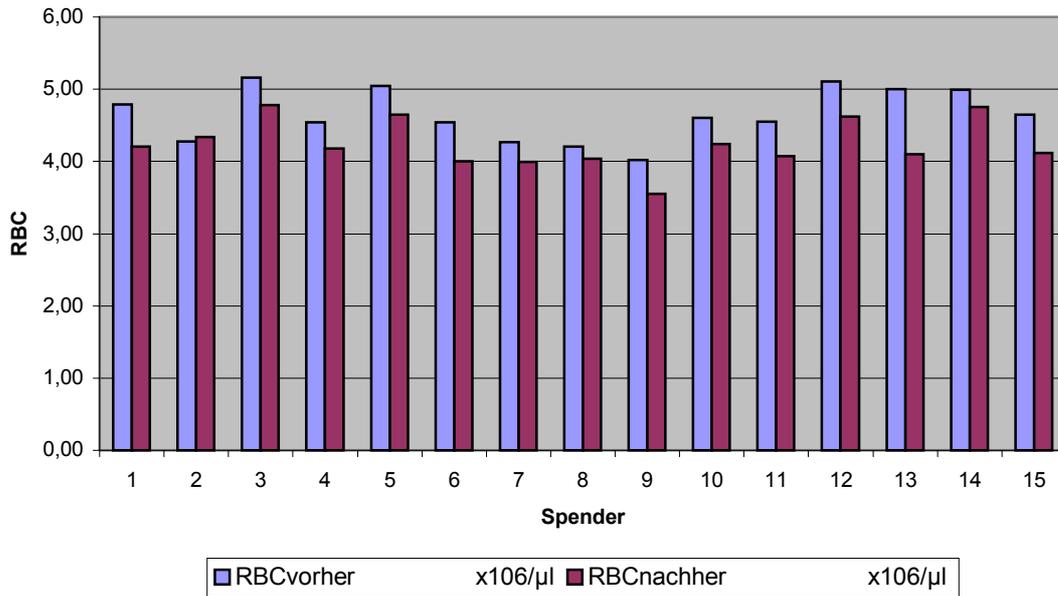


Abb.3.2. Einfluß der Zytapherese auf HGB bei Spendern der Pilotstudie

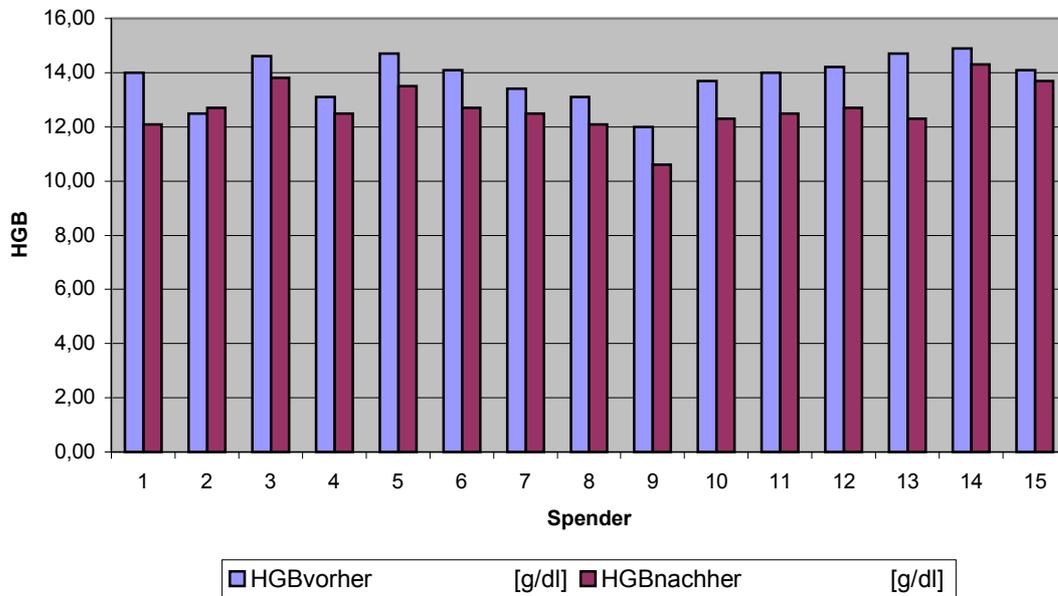
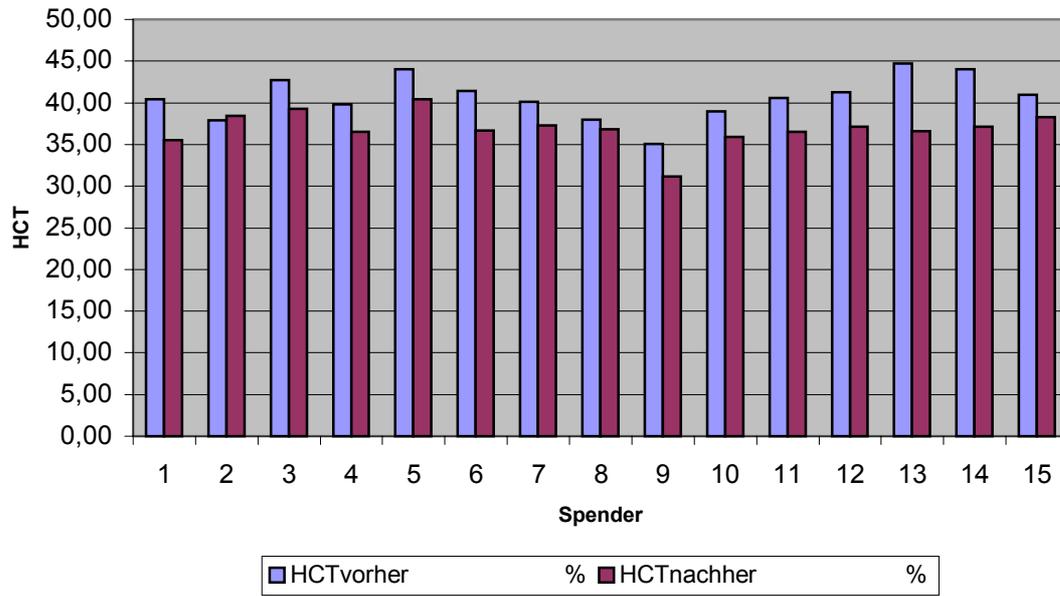


Abb.3.3 Einfluß der Zytapherese auf HCT bei Spendern der Pilotstudie



**Tabelle 3.5.** Einfluß der Zytapherese auf Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit der Spender (Hauptstudie)

Spender	RBC <sub>vorher</sub> x10 <sup>6</sup> /µl	RBC <sub>nachher</sub> x10 <sup>6</sup> /µl	HGB <sub>vorher</sub> [g/dl]	HGB <sub>nachher</sub> [g/dl]	HCT <sub>vorher</sub> %	HCT <sub>nachher</sub> %
1 WA	4,21	3,97	12,80	12,20	37,40	35,30
2 BD	4,61	4,20	14,60	13,30	43,00	39,10
3 KD	4,35	4,00	12,60	11,70	38,10	35,30
4 SK	4,29	3,86	12,80	11,80	38,80	34,90
5 LS	4,42	3,95	12,50	11,30	37,20	33,30
6 KiA	5,02	4,54	13,60	12,40	41,00	36,70
7 SC	5,38	4,76	16,10	14,40	47,60	42,00
8 BA	4,09	3,52	12,30	10,50	36,70	31,60
9 StM	5,38	4,87	14,90	13,80	45,60	41,10
10 SW	4,56	4,35	13,60	12,90	39,50	37,60
11 WL	4,84	4,47	14,80	13,70	43,30	40,00
12 TD	4,00	4,18	13,80	12,90	41,20	37,70
13 CM	5,37	5,17	15,20	14,70	46,20	44,50
14 SA	4,49	4,06	13,70	12,30	40,70	36,70
15 BS	5,23	4,55	16,00	14,20	47,20	41,20
16 BIA	4,52	4,37	13,60	13,30	40,00	38,40
17 GV	4,62	4,08	14,30	12,50	42,90	37,90
18 KA	4,40	4,30	12,00	11,80	37,40	36,70
19 TR	5,36	4,85	16,20	13,80	45,60	41,60
20 KM	4,91	4,58	14,10	13,30	45,50	42,40
21 KI	4,48	4,50	13,60	13,20	41,70	39,00
22 KÖ	5,24	4,88	14,50	13,90	43,30	40,40
23 SM	4,94	4,56	13,70	12,60	41,90	38,50
24 WR	5,46	5,17	16,50	15,70	48,90	46,50
x	4,76	4,41	14,08	13,01	42,11	38,68
SD	0,46	0,42	1,28	1,18	3,61	3,47
MA	4,62	4,42	13,75	13,05	41,80	38,45
R	1,46	1,65	4,50	5,20	12,20	14,90
x <sub>min</sub>	4,00	3,52	12,00	10,50	36,70	31,60
x <sub>max</sub>	5,46	5,17	16,50	15,70	48,90	46,50
p(t-Test)	< 0,001		< 0,001		< 0,001	

Abb.3.4 Einfluß der Zytapherese auf RBC bei Spendern der Hauptstudie

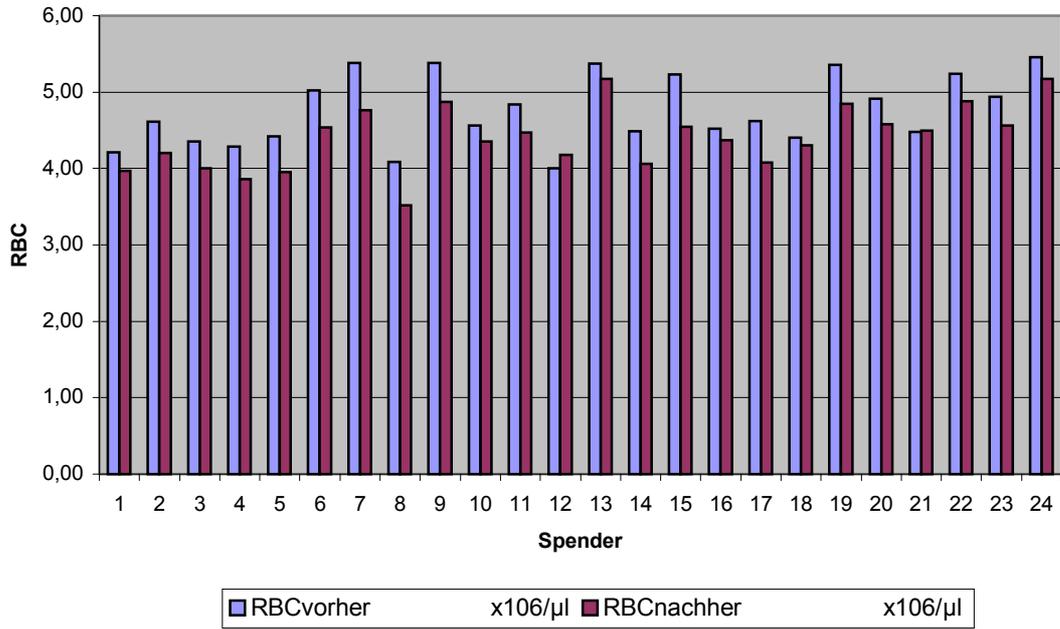
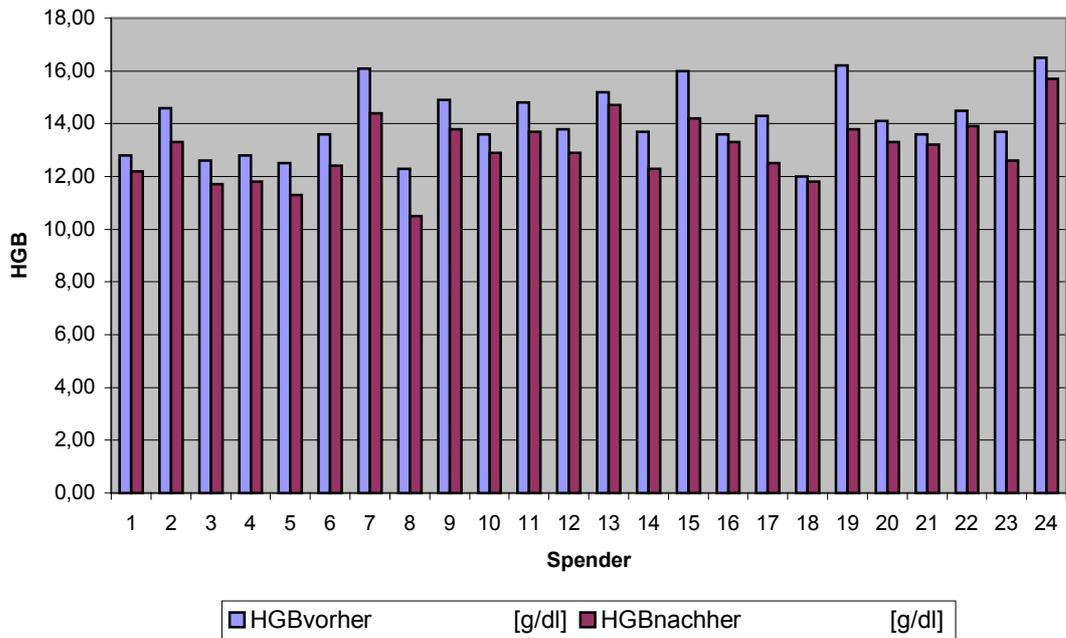


Abb.3.5 Einfluß der Zytapherese auf HGB bei Spendern der Hauptstudie



**Abb.3.6. Einfluß der Zytapherese auf den HCT bei Spendern der Hauptstudie**

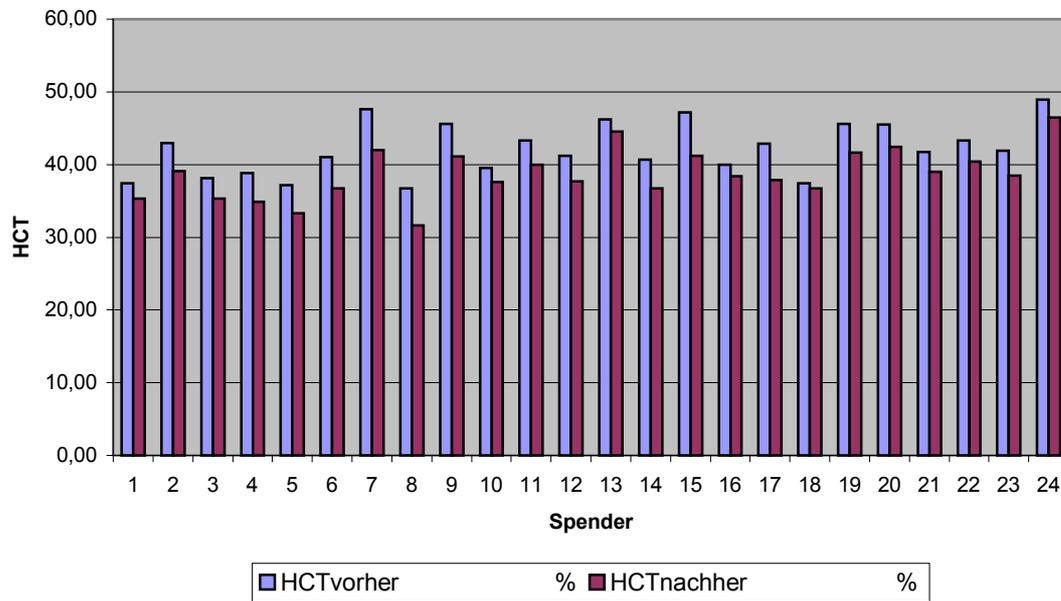


Tabelle 3.6 und 3.7 und die Abbildungen 3.7-3.12 stellen Veränderungen der Anzahl an Leukozyten, Thrombozyten und Lymphozyten der Spender vor und nach Zytapherese dar.

**Tabelle 3.6.** Änderung der Leukozyten-, Thrombozyten- und Lymphozytenzahl während der Zytapherese bei Spendern der Pilotstudie

Spender	WBC <sub>vorher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	WBC <sub>nachher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	PLT <sub>vorher</sub> x10 <sup>3</sup> /µ	PLT <sub>nachher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	LYM <sub>vorher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	LYM <sub>nachher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl
1 LS	6,70	4,60	342,00	225,00	3,10	1,70
2 BA	7,60	9,20	409,00	336,00	3,20	2,30
3 KÖ	8,70	7,10	182,00	150,00	2,80	2,10
4 GC	6,10	6,80	179,00	144,00	1,90	1,40
5 EE	8,40	6,30	227,00	175,00	3,20	2,30
6 HI	6,80	4,70	189,00	124,00	2,50	1,30
7 SL	6,90	6,70	206,00	174,00	2,20	1,80
8 SK	6,90	5,70	223,00	182,00	2,40	1,60
9 MP	3,60	3,10	186,00	148,00	1,00	0,70
10 SW	6,80	5,90	261,00	208,00	2,40	1,70
11 SA	13,50	12,50	295,00	254,00	2,80	2,50
12 KiA	5,50	4,90	169,00	142,00	1,30	1,10
13 BIA	5,70	4,90	279,00	206,00	1,60	1,30
14 SC	6,30	5,90	203,00	174,00	2,30	1,70
15 StM	6,60	5,90	268,00	228,00	2,40	2,20
x	7,07	6,28	241,20	191,33	2,34	1,71
SD	2,15	2,21	68,32	54,49	0,66	0,50
MA	6,80	5,90	223,00	175,00	2,40	1,70
R	9,90	9,40	240,00	212,00	2,20	1,80
x <sub>min</sub>	3,60	3,10	169,00	124,00	1,00	0,70
x <sub>max</sub>	13,50	12,50	409,00	336,00	3,20	2,50
p(t-Test)	0,009		< 0,001*		< 0,001	
<b>* hier waren die Daten nicht normalverteilt . Es kam der Wilcoxon-Test zum Einsatz.</b>						

Abb.3.7. Einfluß der Zytapherese auf WBC bei Spendern der Pilotstudie

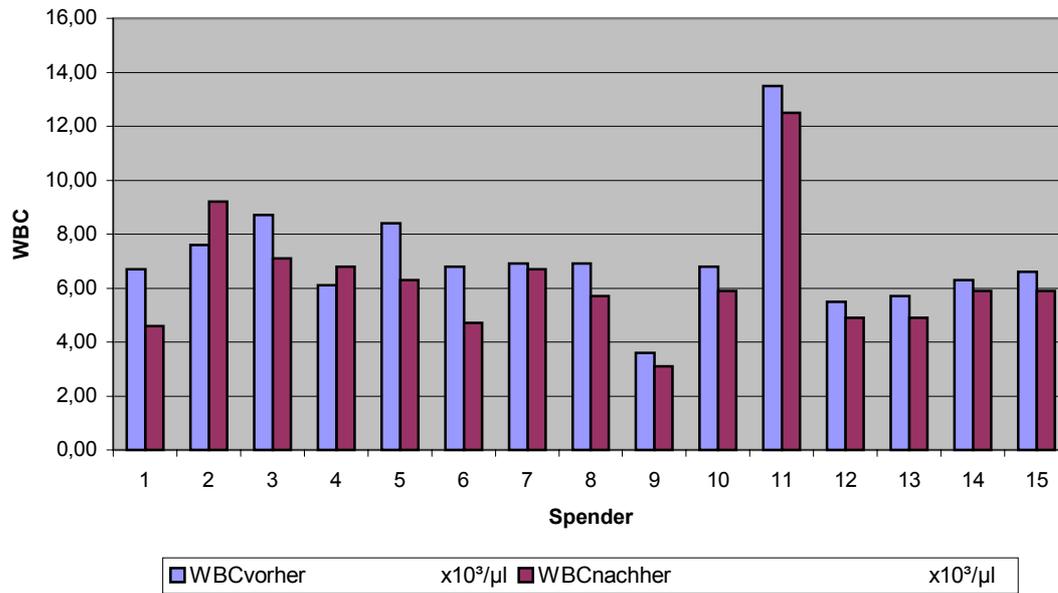


Abb.3.8. Einfluß der Zytapherese auf PLT bei Spendern der Pilotstudie

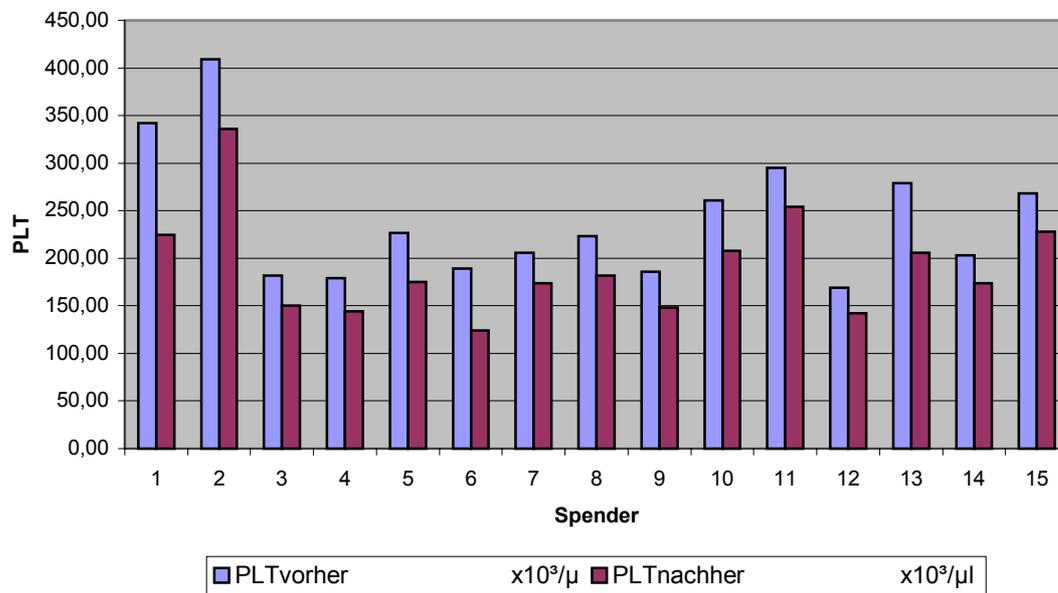
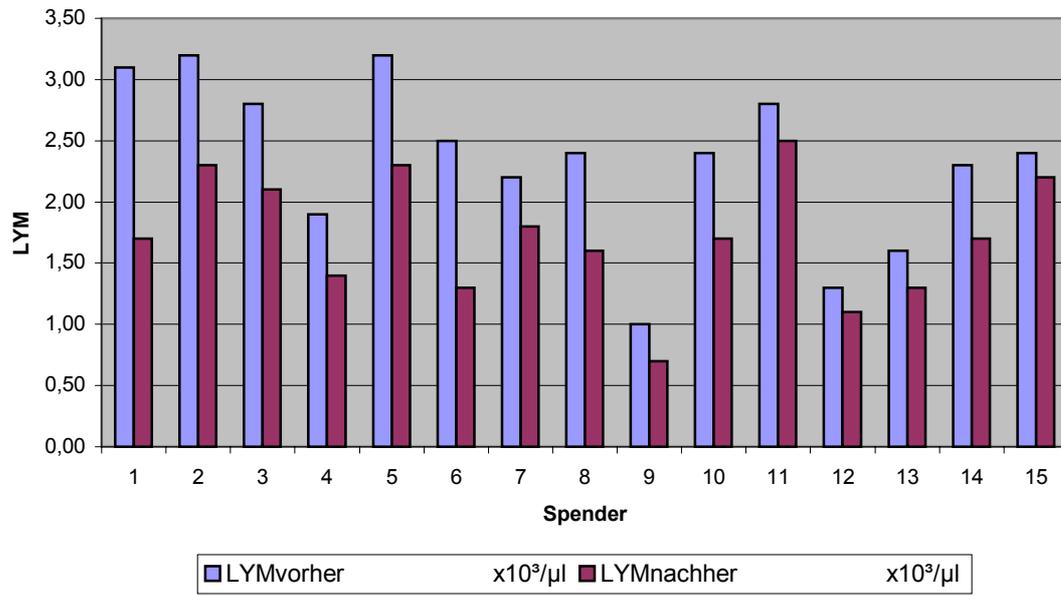


Abb.3.9. Einfluß der Zytapherese auf LYM bei Spendern der Pilotstudie



**Tabelle 3.7.** Einfluß der Zytapherese auf die Anzahl der Leukozyten, Thrombozyten und Lymphozyten der Spender der Hauptstudie

Spender	WBC <sub>vorher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	WBC <sub>nachher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	PLT <sub>vorher</sub> x10 <sup>3</sup> /µ	PLT <sub>nachher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	LYM <sub>vorher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	LYM <sub>nachher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl
1 WA	3,90	3,70	240,00	175,00	1,10	1,00
2 BD	7,00	5,80	232,00	152,00	1,80	1,40
3 KD	5,60	5,60	258,00	210,00	1,60	1,50
4 SK	7,30	6,20	251,00	204,00	2,60	1,70
5 LS	5,80	4,00	313,00	236,00	2,50	1,50
6 KiA	6,50	5,10	173,00	146,00	1,80	1,30
7 SC	5,90	4,90	232,00	184,00	1,70	1,10
8 BA	9,20	7,20	291,00	229,00	3,50	2,50
9 StM	7,00	6,00	285,00	238,00	2,10	1,70
10 SW	6,30	5,70	256,00	189,00	2,30	1,90
11 WL	10,60	9,40	344,00	261,00	3,30	2,10
12 TD	11,20	9,60	287,00	290,00	1,60	1,40
13 CM	6,70	5,30	249,00	176,00	2,00	1,20
14 SA	7,40	6,10	334,00	264,00	2,20	1,70
15 BS	4,80	3,70	206,00	155,00	1,50	0,70
16 BIA	7,40	6,40	275,00	205,00	1,30	1,20
17 GV	7,50	5,60	319,00	229,00	3,40	1,70
18 KA	5,10	6,40	240,00	198,00	2,20	1,40
19 TR	5,60	4,30	182,00	150,00	1,90	1,30
20 KM	5,40	5,20	160,00	128,00	1,80	1,70
21 KI	6,40	5,60	247,00	198,00	1,50	0,80
22 KÖ	9,20	7,50	181,00	144,00	3,10	2,00
23 SM	7,00	7,30	243,00	215,00	1,50	1,10
24 WR	7,20	6,30	204,00	159,00	1,70	1,00
x	6,92	5,95	250,08	197,29	2,08	1,45
SD	1,73	1,50	50,22	42,66	0,67	0,43
MA	6,85	5,75	248,00	198,00	1,85	1,40
R	7,30	5,90	184,00	162,00	2,40	1,80
x <sub>min</sub>	3,90	3,70	160,00	128,00	1,10	0,70
x <sub>max</sub>	11,20	9,60	344,00	290,00	3,50	2,50
p(t-Test)	<b>&lt; 0,001*</b>		< 0,001		< 0,001	
<b>* hier waren die Daten nicht normalverteilt. Es kam der Wilcoxon-Test zum Einsatz.</b>						

Abb.3.10. Einfluß der Zytapherese auf WBC bei Spendern der Hauptstudie

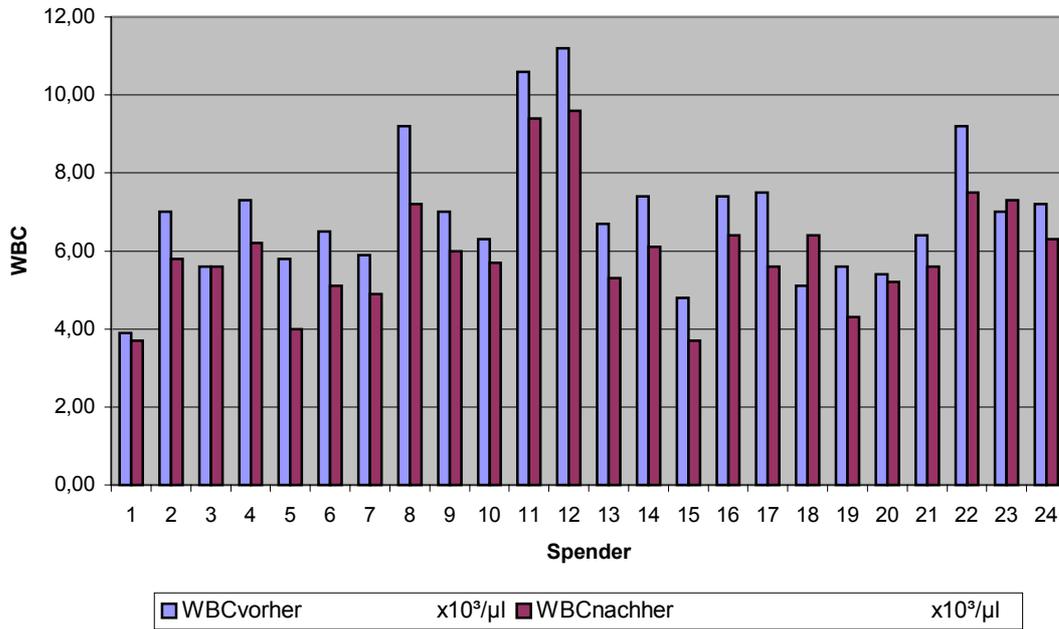


Abb.3.11. Einfluß der Zytapherese auf PLT bei Spendern der Hauptstudie

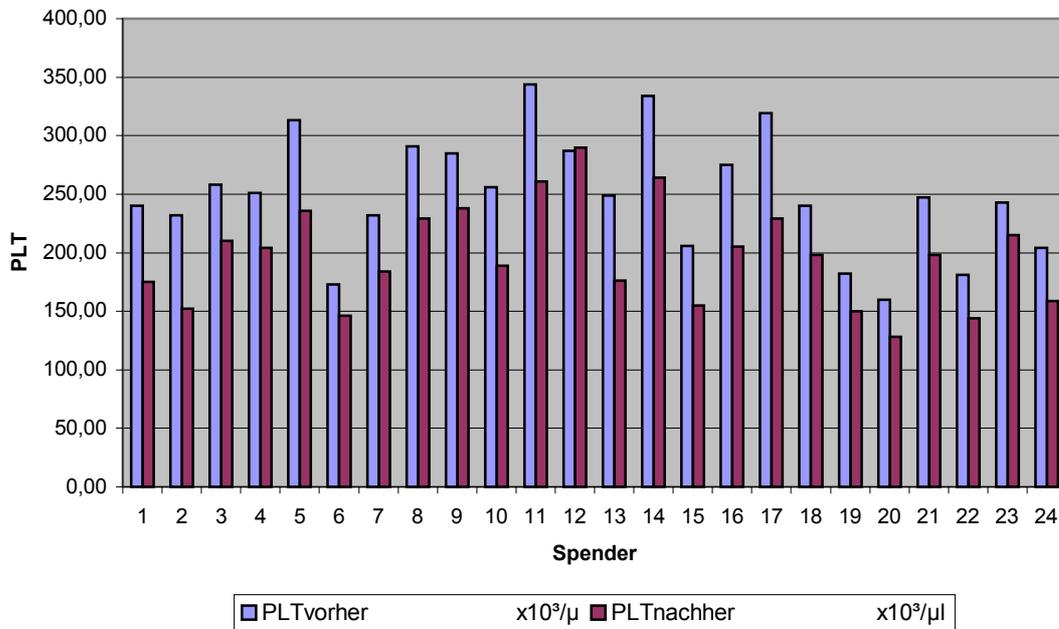
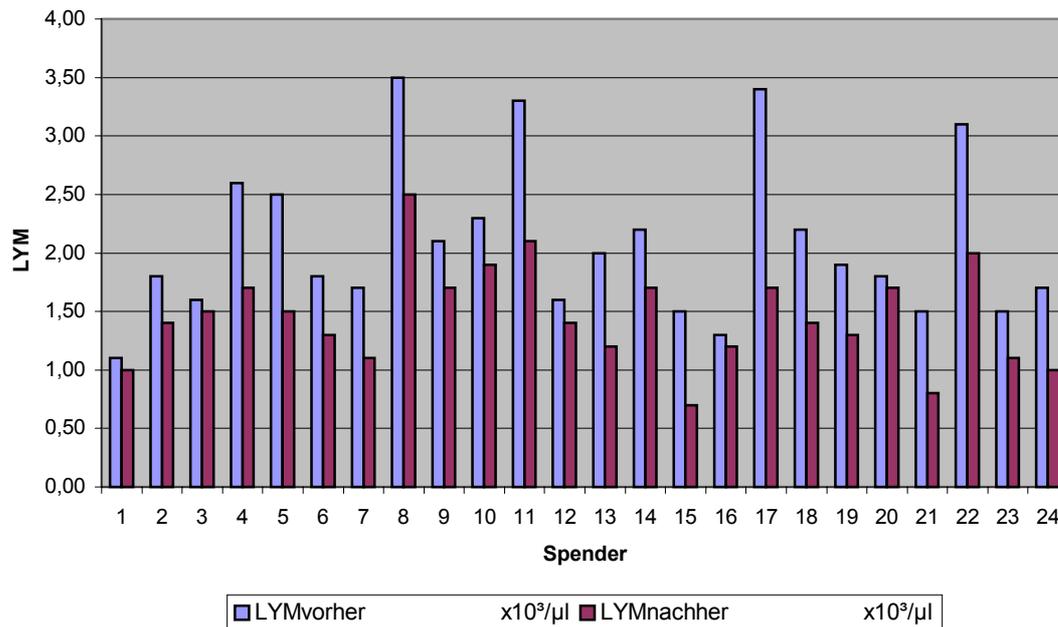


Abb.3.12. Einfluß der Zytapherese auf LYM bei Spendern der Hauptstudie



Beim Vergleich der Blutbildparameter vor und nach Durchführung der Zytapherese ergaben sich sowohl bei den Spendern der Pilotstudie als auch bei denen der Hauptstudie signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$  im t-Test für normalverteilte verbundene Stichproben, bzw. Wilcoxon-Test bei nicht normalverteilten Stichproben). Zwischen der Gruppe der Spender der Hauptstudie und den Spendern der Pilotstudie zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied.

### 3.1.3 Infektionsparameter

Die Tabellen 3.8 und 3.9 geben eine Übersicht über das Infektionsscreening, das bei allen Spendern durchgeführt wurde. Die Überprüfung der Infektionsserologie umfaßte dabei Test auf TPHA, HbsAg, Anti-HBc, Anti-HCV, HCV-Cobas, Anti-HIV1,2,0 und Anti-CMV(IgG/IgM).

**Tabelle 3.8.** Leukozytenzahl, C-reaktives Protein und Infektionsserologie der Spender der Pilotstudie

Spender	WBC <sub>vorher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	CRP [mg/dl]	Infektionsserologie
1 LS	6,70	< 0.5	Routine unauffällig
2 BA	7,60	< 0.5	Routine unauffällig
3 KÖ	8,70	< 0.5	Routine unauffällig
4 GC	6,10	< 0.5	Routine unauffällig
5 EE	8,40	< 0.5	Routine unauffällig
6 HI	6,80	< 0.5	Routine unauffällig
7 SL	6,90	< 0.5	Routine unauffällig
8 SK	6,90	< 0.5	Routine unauff., CMV pos.
9 MP	3,60	<b>0,8</b>	Routine unauffällig
10 SW	6,80	< 0.5	Routine unauffällig
11 SA	13,50	< 0.5	Routine unauffällig
12 KiA	5,50	< 0.5	Routine unauffällig
13 BIA	5,70	< 0.5	Routine unauffällig
14 SC	6,30	< 0.5	Routine unauff., CMV pos.
15 StM	6,60	< 0.5	Routine unauffällig

Bei keinem der Spender der Pilotstudie konnte ein Anhalt für ein aktives Krankheitsgeschehen zum Zeitpunkt der Zytapherese festgestellt werden. Die Anamnese und der körperliche Befund der Probanden waren unauffällig, ebenso wie die Zahl der Leukozyten und das C-reaktive Protein. Lediglich bei Spender 9 MP war das CRP minimal erhöht. Bei Spender 11 SA lag die Zahl der Leukozyten gering oberhalb des oberen Normwertes (10x10<sup>3</sup>/µl). Die Infektionsserologie wurde bei allen Probanden als Routine unauffällig registriert.

**Tabelle 3.9.** Leukozytenzahl, C-reaktives Protein und Infektionsserologie der Spender der Hauptstudie

Spender	WBC <sub>vorher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	CRP [mg/dl]	Infektionsserologie
1 WA	3,90	< 0,5	Routine unauffällig
2 BD	7,00	< 0,5	missing data
3 KD	5,60	< 0,5	Routine unauffällig
4 SK	7,30	< 0,5	Routine unauffällig
5 LS	5,80	< 0,5	Routine unauffällig
6 KiA	6,50	< 0,5	Routine unauffällig
7 SC	5,90	< 0,5	Routine unauffällig
8 BA	9,20	< 0,5	Routine unauffällig
9 StM	7,00	< 0,5	Routine unauffällig
10 SW	6,30	< 0,5	Routine unauffällig
11 WL	10,60	< 0,5	<b>Anti-HBc auffällig !!!</b>
12 TD	11,20	< 0,5	Routine unauffällig
13 CM	6,70	< 0,5	Routine unauffällig
14 SA	7,40	< 0,5	Routine unauffällig
15 BS	4,80	< 0,5	Routine unauffällig
16 BIA	7,40	< 0,5	Routine unauffällig
17 GV	7,50	< 0,5	Routine unauffällig
18 KA	5,10	< 0,5	Routine unauffällig
19 TR	5,60	< 0,5	Routine unauffällig
20 KM	5,40	< 0,5	Rout. unauff. + <b>antiCMV pos.</b>
21 KI	6,40	< 0,5	Routine unauffällig
22 KÖ	9,20	< 0,5	Rout. unauff. + <b>antiCMV pos.</b>
23 SM	7,00	< 0,5	Routine unauffällig
24 WR	7,20	< 0,5	Routine unauffällig

Die Anamnese und der körperliche Befund aller Spender der Hauptstudie ergaben keinen Anhalt für ein aktives Krankheitsgeschehen zum Zeitpunkt der Spende. Die Infektionsserologie wurde bei allen Spendern, bis auf Spender 11 WL, der als Anti-HBc auffällig befundet wurde, als Routine unauffällig eingestuft. Das C-reaktive Protein war bei allen Probanden im Normbereich (<0,5mg/dl). Die Leukozytenzahl lag lediglich bei den Probanden 11 WL und 12 TD knapp oberhalb des oberen Grenzwertes des Normbereiches (4-10x10<sup>3</sup>/µl).

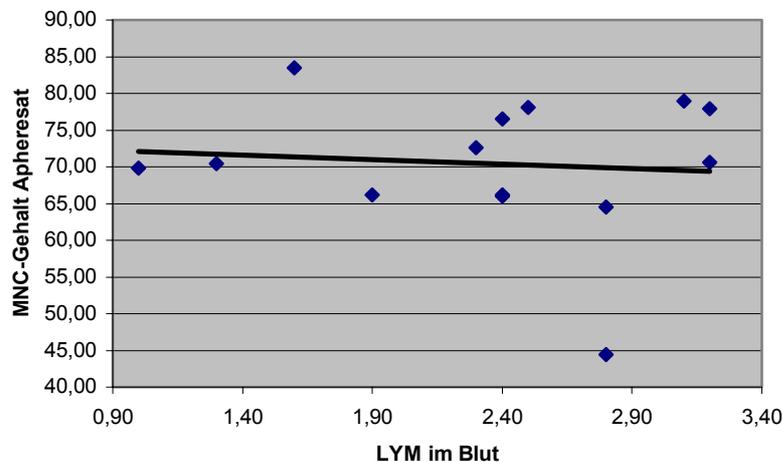
### 3.1.4 Zusammenhang zwischen Lymphozytenzahl bei Blutentnahme und MNC-Ausbeute im Apheresat

Die beiden Tabellen 3.10 und 3.11 und die Abbildungen 3.13 und 3.14 stellen jeweils den Zusammenhang zwischen der Lymphozytenzahl im peripheren Blut und deren Gehalt im gewonnenen Zellkonzentrat bei den Spendern der Hauptstudie und bei denen der Pilotstudie dar.

**Tabelle 3.10.** Zusammenhang zwischen der Lymphozytenzahl im peripheren Blut und deren Gehalt im gewonnenen Zellkonzentrat bei Spendern der Pilotstudie

Spender	LYM <sub>vorher</sub> x10 <sup>9</sup> /µl	MNC-Gehalt Apheresat %
1 LS	3,10	79,00
2 BA	3,20	70,60
3 KÖ	2,80	44,40
4 GC	1,90	66,20
5 EE	3,20	77,90
6 HI	2,50	78,10
7 SK	2,40	66,00
8 MP	1,00	69,80
9 SW	2,40	66,20
10 SA	2,80	64,50
11 KiA	1,30	70,40
12 BIA	1,60	83,50
13 SC	2,30	72,60
14 StM	2,40	76,50
15 SL	2,20	missing data
Korrelation	-0,089	

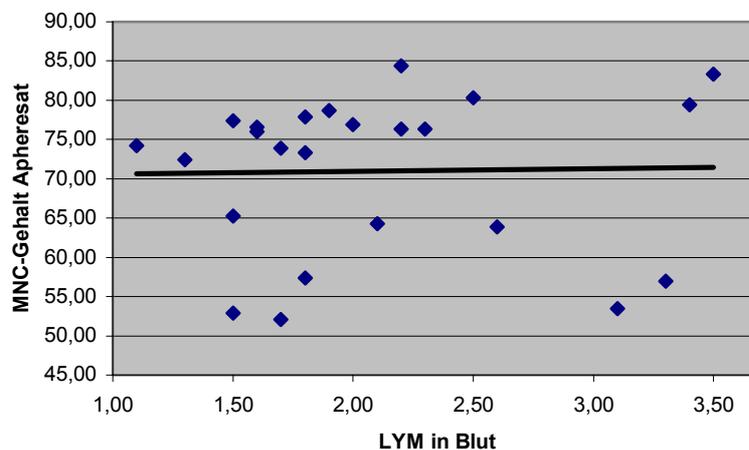
**Abb.3.13.** Lymphozytenzahl im Blut und MNC-Gehalt im Apheresat



**Tabelle 3.11.** Lymphozytenzahl im peripheren Blut und Anreicherung dieser Zellen im gesammelten Zellkonzentrat bei Spendern der Hauptstudie

Spender	LYM <sub>vorher</sub> x10 <sup>3</sup> /µl	MNC-Gehalt Apheresat %
1 WA	1,10	74,20
2 BD	1,80	57,40
3 KD	1,60	76,60
4 SK	2,60	63,90
5 LS	2,50	80,30
6 KiA	1,80	73,30
7 SC	1,70	73,90
8 BA	3,50	83,30
9 StM	2,10	64,30
10 SW	2,30	76,30
11 WL	3,30	57,00
12 TD	1,60	76,00
13 CM	2,00	76,90
14 SA	2,20	76,30
15 BS	1,50	77,40
16 BIA	1,30	72,40
17 GV	3,40	79,40
18 KA	2,20	84,40
19 TR	1,90	78,70
20 KM	1,80	77,90
21 KI	1,50	52,90
22 KÖ	3,10	53,50
23 SM	1,50	65,30
24 WR	1,70	52,10
Korrelation	0,022	

**Abb.3.14.** Lymphozytenzahl im Blut und MNC-Gehalt Im Apheresat



Dabei zeigte sich keine direkte Abhängigkeit des MNC-Gehaltes im Apheresat von der Lymphozytenzahl im peripheren Blut.

## 3.2 Mikrobiologie

### 3.2.1 Ergebnisse des Vorversuches

Zur Auswertung des Vorversuchs wurde die Anzahl KBE der ausgespatelten Verdünnungsstufen  $10^2$ - $10^4$  bestimmt und mit der angestrebten Keimzahl in dieser Verdünnungsstufe verglichen. Jeder Keim durchlief den Vorversuch mindestens drei mal, wobei unterschiedliche  $OD_{465}$  (optische Dichten bei 465nm-Filter) verwendet wurden. Die Tabellen 3.12, 3.13 und 3.14 stellen die Ergebnisse der drei Durchgänge des Vorversuches dar.

**Tabelle 3.12.** Untersuchung des Einflusses der optischen Dichte auf die angestrebte Keimzahl bei der Herstellung quantitativ korrekter Verdünnungsstufen-1. Durchgang

Keim	OD	Verdünnungsstufe	Anzahl KBE
E.coli	0,1	$10^2$	50 statt 100
		$10^3$	360 statt 1000
		$10^4$	4160 statt 10000
C.albicans	0,5	$10^2$	10 statt 100
		$10^3$	40 statt 1000
		$10^4$	310 statt 10000
C.albicans	0,6	$10^2$	0 statt 100
		$10^3$	70 statt 1000
		$10^4$	420 statt 10000
Pseud.aeruginosa	0,05	$10^2$	30 statt 100
		$10^3$	420 statt 1000
		$10^4$	4500 statt 10000
Pseud.aeruginosa	0,1	$10^2$	90 statt 100
		$10^3$	500 statt 1000
		$10^4$	4500 statt 10000
CNS	0,1	$10^2$	20 statt 100
		$10^3$	110 statt 1000
		$10^4$	8800 statt 10000
Staph.aureus	0,1	$10^2$	110 statt 100
		$10^3$	500 statt 1000
		$10^4$	4000 statt 10000

**Tabelle 3.13.** Untersuchung des Einflusses der optischen Dichte auf die angestrebte Keimzahl bei der Herstellung quantitativ korrekter Verdünnungsstufen-2. Durchgang

Keim	OD	Verdünnungsstufe	Anzahl KBE
E.coli	0,13	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	100: optimal 400 statt 1000 7200 statt 10000
C.albicans	1,0	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	30 statt 100 900 statt 1000 2560 statt 10000
Pseud.aeruginosa	0,13	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	110 statt 100 1000: optimal 9200 statt 10000
CNS	0,13	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	10 statt 100 700 statt 1000 1340 statt 10000
Staph.aureus	0,13	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	30 statt 100 440 statt 1000 6000 statt 10000

**Tabelle 3.14.** Untersuchung des Einflusses der optischen Dichte auf die angestrebte Keimzahl bei der Herstellung quantitativ korrekter Verdünnungsstufen-3. Durchgang

Keim	OD	Verdünnungsstufe	Anzahl KBE
E.coli	0,13	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	80 statt 100 640 statt 1000 9600 statt 10000
C.albicans	1,32	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	0 statt 100 180 statt 1000 1520 statt 10000
Pseud.aeruginosa	0,13	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	110 statt 100 870 statt 1000 10000:optimal
CNS	0,15	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	30 statt 100 210 statt 1000 2240 statt 10000
Staph.aureus	0,15	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	50 statt 100 800 statt 1000 9200 statt 10000

Bestimmt wurde in den drei Testdurchgängen pro Keim die OD, bei der die genauesten Verdünnungsstufen erzielt werden konnten. Tabelle 3.15 fasst die Auswertung der drei Durchläufe mit den unterschiedlichen optischen Dichten zusammen.

**Tabelle 3.15.** Zusammenfassung der Auswertung der drei Durchgänge des Vorversuches

Keim:	1. Fassung:	2. Fassung:	3. Fassung:
E.coli	0,1	0,13	<b><u>0,13</u></b>
C.albicans	0,5 und 0,6	1,0	1,32
Pseud.aeruginosa	0,1 und 0,05	0,13	<b><u>0,13</u></b>
CNS	0,1	0,13	<b><u>0,15</u></b>
Staph.aureus	0,1	0,13	<b><u>0,15</u></b>

Die unterstrichenen und fettgedruckten verwendeten optischen Dichten (OD) sind diejenigen, die der angestrebten Keimzahl bei der Auszählung der Koloniebildenden Einheiten (KBE) der Kontrollausstriche am nächsten kamen und mit denen bei den weiteren Versuchen gearbeitet werden sollte. Bei C.albicans lagen die Anzahlen KBE der Kontrollausstriche noch weit unter dem Sollwert, weshalb bei diesem Keim in der Hauptstudie eine höhere OD (1,4) bei der Herstellung der Verdünnungsstufen verwendet werden sollte.

### 3.2.2 Resultate der Pilotstudie

Jedes der 15 MNC-Apheresate wurde mit jeweils einem der fünf Keime, in den Verdünnungsstufen  $10^{-2}$ - $10^7$  gezielt kontaminiert und anschließend in der Mikrobiologie auf positives Keimwachstum untersucht. Jeder Keim durchlief diese Pilotphase dreimal. Bei jedem Versuchsansatz diente dabei eine Negativkontrolle als Sterilitätskriterium. Tabelle 3.16 listet die mikrobiologischen Befunde der eingesandten Blutkultur-Sets auf.

**Tabelle 3.16.** Mikrobiologische Befunde der Pilotstudie

Spender	Keim	Neg-Kontr.	Verdünnungsstufe										
			$10^{-2}$	$10^{-1}$	$10^0$	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	
1 LS	E.coli	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 BA	E.coli	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 KÖ	E.coli	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 GC	Pseud.aerug.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5 EE	Pseud.aerug.	-	+	-	-	* <sup>1</sup>	-	+	+	+	+	+	+
6 HI	Pseud.aerug.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7 SL	Staph.aureus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 SK	Staph.aureus	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9 MP	Staph.aureus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 SW	CNS	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 SA	Candida alb.	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12 KiA	CNS	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
13 BIA	CNS	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
14 SC	Candida alb.	-	-	-	+	+	* <sup>2</sup>	* <sup>2</sup>	+* <sup>2</sup>	+* <sup>2</sup>	+	+	+
15 StM	Candida alb.	-	-	-	* <sup>2</sup>	+* <sup>2</sup>	+	* <sup>2</sup>	* <sup>2</sup>	+	+	+	+

- kein Wachstum

+ positiver Keimnachweis im gezielt kontaminierten Apheresat

\*<sup>1</sup> ungewollte Kontamination mit E.coli

\*<sup>2</sup> ungewollte Kontamination mit CNS

Für jeden der fünf Keime wurde in den drei Testdurchläufen diejenige Verdünnungsstufe als Keimnachweisgrenze bestimmt, die als erste nach einem negativen Befund als positiv befundet wurde. Bei den Spendern 14 und 15, deren Apheresate am selben Tag kontaminiert wurden, war kein ATTC-Stamm von Candida albicans zur Hand, weshalb mit einem Candida albicans-Stamm aus Patienten-Isolat gearbeitet werden mußte. Möglicherweise war dieses Isolat nicht 100%ig rein, was eine mögliche Erklärung für die aufgetretene Kontamination der Verdünnungsstufen  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  bei Spender 14 und der Verdünnungsstufen  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  bei Spender 15 wäre. Es könnte sich aber ebenfalls um eine unbeabsichtigte Kontamination der Proben mit Keimen der Hautflora handeln.

Da bei Spender 14 die Konversion negativer Keimnachweis zu positivem Keimnachweis schon vor der zusätzlichen Kontamination mit CNS stattfand, konnte bei diesem Ansatz die Verdünnungsstufe  $10^0$  ohne weiteres als Keimnachweisgrenze festgelegt werden. In Phase 2, 15 wurde die Verdünnungsstufe  $10^1$  als Keimnachweisgrenze bestimmt, da dort als erstes Wachstum von *Candida albicans* trotz zusätzlicher Kontamination mit CNS nachgewiesen werden konnte. Tabelle 3.17 faßt die Keimnachweisgrenzen der einzelnen Erreger nochmals zusammen.

**Tabelle 3.17.** Keimnachweisgrenze der fünf Erreger in den drei Durchgängen der Pilotstudie

Keim	Nachweisgrenze 1	Nachweisgrenze 2	Nachweisgrenze 3	Modalwert
E.coli	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$
Pseud.aerug.	$10^3$	$10^3$	$10^1$	$10^3$
Staph.aureus	$10^0$	$10^1$	$10^0$	$10^0$
CNS	$10^0$	$10^1$	$10^1$	$10^1$
Candida alb.	$10^1$	$10^0$	$10^1$	$10^1$

Je Keim wurde der Modalwert der Keimnachweisgrenzen der drei Testdurchläufe bestimmt, um damit die endgültige Verdünnungsstufe festzulegen, mit der im Hauptversuch kontaminiert werden sollte. Das war für E.coli die Verdünnungsstufe  $10^{-2}$ , für *Pseudomonas aeruginosa*  $10^3$ ,  $10^0$  für Staph.aureus, und die Verdünnungsstufe  $10^1$  sowohl für CNS als auch für *Candida albicans*.

Wie schon im Vorversuch wurde von jeder Verdünnungsreihe eine Qualitätskontrolle angefertigt und die Anzahl KBE auf der Agarplatte bestimmt. Tabelle 3.18 listet die gewonnenen Ergebnisse auf.

**Tabelle 3.18.** Ergebnisse der Ausstrichkontrolle bei der Pilotstudie

Keim	OD	Verd.stufen	Anzahl KBE
E.coli	0,13	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	30 statt 100 570 statt 1000 2800 statt10000
Pseudomonas aeruginosa	0,13	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	130 statt 100 700 statt 1000 4560 statt10000
Staph. aureus	0,15	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	90 statt 100 960 statt 1000 8960 statt10000
Staph. aureus	0,15	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	170 statt 100 520 statt 1000 9600 statt10000
CNS	0,15	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	130 statt 100 960 statt 1000 9600 statt10000
CNS	0,15	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	10 statt 100 130 statt 1000 2400 statt10000
Candida alb.	1,4	10 <sup>2</sup> 10 <sup>3</sup> 10 <sup>4</sup>	60 statt 100 310 statt 1000 8400 statt10000

### 3.2.3 Auswertung des Hauptversuches

Für die Hauptstudie wurden 24 Zytapheresen an 24 freiwilligen gesunden Spendern durchgeführt. Bei jeder Apherese arbeiteten wir pro Keim mit einer Positivkontrolle und einer, mit demselben Keim kontaminierten, Probe für die Kryokonservierung. Zusätzlich wurde bei jedem Versuchsansatz eine Negativkontrolle als Sterilitätskriterium angefertigt. Die gezielte Kontamination erfolgte mit den im Pilotversuch erarbeiteten Verdünnungsstufen. Tabelle 3.19 faßt die mikrobiologischen Befunde der eingesandten Blutkulturen zusammen.

**Tabelle 3.19.** Mikrobiologische Befunde der Hauptstudie

Spender	Neg-Kontr.	Cand.alb.		E.coli		CNS		Staph.aur.		Pseud.aerug.	
		Pos.	Kryo	Pos.	Kryo	Pos.	Kryo	Pos.	Kryo	Pos.	Kryo
1 WA	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
2 BD	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 KD	-	+	+	+	-!	+	+	+	+	+	+
4 SK	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 LS	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
6 KiA	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
7 SC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 BA	-	+	+	+	-!	+	+	+	+	+	+
9 StM	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
10 SW	-	+	+	-	*1	+	+	+	+	+	+
11 WL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12 TD	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13 CM	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 SA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15 BS	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16 BIA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17 GV	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+ *2	+ *2
18 KA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+ *2	+ *2
19 TR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20 KM	-	+	+	+	-!	+	+	+	+	+	+
21 KI	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22 KÖ	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23 SM	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 WR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

die dickumrandeten Proben wurden mit E.coli  $10^2$  gezielt kontaminiert, die anderen mit E.coli  $10^1$

- kein Wachstum

+ positiver Keimnachweis im gezielt kontaminierten Apheresat

\*1 ungewollte Kontamination mit CNS

\*2 zusätzlich unbeabsichtigte Kontamination mit Staph.aureus

Eine Versuchsabänderung mußte bei der gezielten Kontamination mit E.coli vorgenommen werden: 12 der gewonnenen Apheresate wurden mit E.coli in einer Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$ , der im Pilotversuch festgelegten Keimnachweisgrenze, gezielt kontaminiert.

Drei mal geschah es, dass bei der Verwendung dieser niedrigen Verdünnungsstufe von E.coli die Positivkontrolle zwar als positiv befundet wurde, jedoch kein Keimnachweis in der kryokonservierten Probe gelang (Spender 03,08,20). Nachdem es aber bei fünf von zwölf dieser Versuchsansätze bereits in den Positivkontrollen zu einem ausbleibenden Keimwachstum kam (Spender 01,05,06,09,10), dürfen die Versuchsansätze, bei denen mit der Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$  gearbeitet wurde, strenggenommen nicht in die Auswertung der Ergebnisse der Arbeit eingehen.

Aus diesem Grund wurden die restlichen 12 Versuchsansätze mit E.coli in einer Verdünnungsstufe eine Zehnerpotenz größer ( $10^{-1}$ ) gezielt kontaminiert.

Sobald mit E.coli in dieser Verdünnungsstufe gearbeitet wurde, konnte in allen 12 Positivkontrollen Wachstum nachgewiesen werden, wodurch alle Ansätze für den Versuch verwertbar waren. Außerdem kam es bei der Verwendung von E.coli in der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  auch nie zu einem ausbleibendem Keimnachweis nach Kryokonservierung der Proben.

Tabelle 20 stellt diese Ergebnisse nochmals zusammenfassend dar.

**Tabelle 3.20.** Gesamtdarstellung der Ergebnisse bei Verwendung des Bakteriums E.coli in den Versuchsansätzen

	E.coli Verd. Stufe $10^{-2}$ *		E.coli Verd. Stufe $10^{-1}$	
	Wachstum	kein Wachstum	Wachstum	kein Wachstum
Positivkontrollen	7	5	12	0
Kryokonservierte Proben	4	3	12	0

\*Diese Versuchsansätze dürfen nicht gewertet werden, da bereits in fünf Positivkontrollen kein Keimnachweis gelang.

Alle anderen Keime wiesen nach gezielter Kontamination mit der in der Pilotstudie festgelegten Verdünnungsstufe sowohl in den Positivkontrollen als auch in den kryokonservierten Proben Keimwachstum auf. Bei Spender 17 und 18 wurden in den Positivkontrollen und den korrespondierenden kryokonservierten Apheresaten, die gezielt mit *Pseudomonas aeruginosa*  $10^3$  kontaminiert worden waren, ein zusätzliches Wachstum von *Staph. aureus* nachgewiesen. Dies rührt höchstwahrscheinlich von einer ungewollten Kontamination der Keimsuspension bei der Herstellung mit Keimen der Hautflora her. Da bei diesen Proben jedoch zudem Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden konnte, hatte dies keine weiteren Konsequenzen für die Auswertung des Versuches.

## 4. Diskussion

Zu Beginn sollen hier einige technische Aspekte zur Methodik erörtert werden.

### 4.1 Schwierigkeiten bei der Herstellung quantitativ objektivierbarer korrekter Keimsuspensionen

Bei der Herstellung der Verdünnungsstufen zur gezielten bakteriellen Kontamination des Apheresates stellten sich Schwierigkeiten heraus, quantitativ korrekte Keimzahlen in den Keimsuspensionen zu erlangen. Da im klinischen Alltag bei der mikrobiologischen Begutachtung von eingesandten Blutkulturen nur von Bedeutung ist, ob Keimwachstum in der Probe nachgewiesen werden kann und wenn ja, um welchen Organismus es sich dabei handelt, ist die Quantität weniger von Bedeutung für den Mediziner da sie ohne weitere Konsequenzen auf das therapeutische Vorgehen bleibt. Daher ist in der Klinik zur Mengenangabe bei positiv befundenen Blutkulturen folgende semiquantitative Einteilung üblich:

- kein Wachstum
- (+) sehr wenig
- + wenig
- ++ mässig viel
- +++ viel

Von einer genauen Angabe über die Anzahl KBE wird dabei abgesehen.

Es gibt kein einheitliches Vorgehen bei der Herstellung von Bakteriensuspensionen, in denen eine bestimmte Anzahl KBE/ml enthalten sein soll. In der Literatur werden verschiedene Vorgehensweisen dazu aufgezeigt:

- Zugabe der Bakterien zu einer genau definierten Anzahl von Leukozyten und anschließend sofortige Analyse der Suspension in einem Durchflußzytometer. Die Anzahl von Bakterien in der Zellsuspension kann dann aus dem Verhältnis der Zell- zu Bakterieninduzierten Signalen im Durchflußzytometer abgeschätzt werden und die gewünschte Inokulationsmenge dementsprechend hergestellt werden.<sup>28)</sup>
- Überimpfen einer Kolonie des Erregers von einer mit diesem fraktioniert beimpften Agarplatte in 5ml Kulturmedium. Nach einem Zeitraum von 3-4h bei 37°C geht man davon aus, dass eine Bakterienkonzentration von  $10^6$  KBE/ml in der Bouillon erreicht wurde.<sup>25)</sup>

Zum Zeitpunkt der Studie wurden im Labor für Mikrobiologie des Universitätsklinikums Großhadern folgende zwei Verfahren zur Herstellung von Inokulationsmengen eingesetzt:

- Grobe Abschätzung der Keimzahl in der Lösung anhand optischer Kontrolle des Trübheitsgrades der Suspension
- Einstellung der Suspension auf eine Optische Dichte (üblicherweise  $OD_{465}$  von 0,1) bei 465nm am Digitalphotometer und dadurch nachträgliches Rückschließen auf die Anzahl KBE in der Lösung

Als die genauere der beiden Methoden stellte sich die zweite heraus, wobei bei Anfertigung von Kontrollausstrichen zur Qualitätskontrolle sich trotzdem noch gravierende Mängel in bezug auf das Erreichen korrekter Keimzahlen in den Suspensionen feststellen ließen. Daher wurde diese Methodik im Laufe des Vorversuches dieser Arbeit noch weiterhin verfeinert, indem nicht mit ein und derselben  $OD_{465}$  bei den fünf Mikroorganismen gearbeitet wurde, sondern individuell für jeden der fünf Keime diejenige  $OD_{465}$  gesucht wurde, bei der die genauesten Ergebnisse bei den Kontrollausstrichen erzielt werden konnten. Die Verfeinerung der herkömmlichen Methodik brachte zwar Verbesserungen, zeigte sich jedoch auch weiterhin noch als ein fehleranfälliges Verfahren, was an den starken Schwankungen der erzielten Anzahl KBE bei Verwendung ein und derselben  $OD_{465}$  für den selben Keim deutlich wurde. So war zum Beispiel im Vorversuch die Anzahl KBE von E.coli bei einer  $OD_{465}$  von 0,13 gut eingestellt, wohingegen bei der Qualitätskontrolle in der Pilotstudie bei Verwendung derselben  $OD_{465}$  eindeutig zu niedrige Keimzahlen in der Verdünnungsstufe erzielt wurden (Vergleiche hierzu Tabellen 3.13 und 3.14 mit Tabelle 3.18). Ebenso verhielt es sich mit den Koagulase-negativen Staphylokokken: bei Verwendung der  $OD_{465}$  von 0,15 im Rahmen der Pilotstudie ließen sich sehr unterschiedliche Anzahlen KBE im Kontrollausstrich isolieren (Vergleiche hierzu Tabelle 3.18). Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die herkömmliche Methodik zwar verbessert werden konnte, dennoch weiter durch eine niedrige Sensitivität limitiert bleibt.

## 4.2 Spenderbelastung

Zytapheresen werden im allgemeinen von Patienten oder Spendern gut vertragen.<sup>69)</sup> Selbst Leukapheresen mit einem großen Volumenumsatz haben sich bei Patienten als gut tolerierbar erwiesen.<sup>52)</sup> Ernste Nebenwirkungen oder schwerwiegende Komplikationen sind selten. Mit dem Absammeln der Zielpopulation ist ein Verlust anderer morphologischer Blutelemente jedoch nicht völlig zu vermeiden. Dadurch kommt es während Zytapheresen regelmäßig zu zellulären Verlusten, die sich in einer Abnahme des Hämatokrit, des Hämoglobingehaltes, der Anzahl von Erythrozyten, Neutrophilen und vor allem einer Abnahme der Thrombozyten widerspiegeln, die eine ähnliche Dichte wie die der Stammzellen aufweisen.<sup>77) 57) 44)</sup> Dieser Zellverlust ist für den Spender meist ohne klinische Signifikanz und wird in einem gewissen Zeitintervall -je nach Zelllinie- durch Steigerung der Hämatopoese wieder ausgeglichen.<sup>77)</sup>

Auch in unserer Studie konnte ein Verlust an morphologischen Blutelementen nachgewiesen werden (siehe dazu Tabelle 3.4-3.7. und Abbildung 3.1-3.12).

Gravierende Nebenwirkungen, die zum Abbruch einer MNC-Apherese gezwungen hätten, traten jedoch bei keinem Spender weder der Pilot- noch der Hauptstudie auf. Anzeichen für eine beginnende Hypokalzämie, wie periorale und/oder periphere, akrale Parästhesien konnten stets erfolgreich durch orale Kalziumsubstitution und gegebenenfalls durch Minderung des Zitratflusses therapiert werden.

Durch die erheblich kürzere Dauer unserer Apheresen im Vergleich zu im klinischen Alltag durchgeführten Stammzellapheresen war das Verfahren viel schonender für die Spender und kaum mit Nebenwirkungen verbunden.

## 4.3 Pilotstudie

Zur gezielten mikrobiellen Kontamination des Apheresates im Hauptversuch sollten Verdünnungsstufen in einer Größenordnung verwendet werden, die der Keimkonzentration bei einer Sepsis nahekommen. Da die Anzahl an Erregern in einem gegebenen Blutvolumen bei Bakteriämie vor allem bei Erwachsenen relativ gering ist und bei einer Keimkonzentration von 1-10 KBE/ml Blut liegt,<sup>82)</sup> bestimmten wir in drei Testdurchgängen je Keim die kleinste Verdünnungsstufe, mit der das Apheresat inokuliert werden muß, um einen positiven mikrobiologischen Befund in der Blutkultur zu erlangen – oder untersuchten wir anders formuliert, mit welcher

Anzahl KBE/ml ein Sample für die Blutkultur kontaminiert sein muß, damit ein positiver mikrobiologischer Nachweis gelingt.

Auf diese Weise sollten im Hauptversuch möglichst realistische sepsis-ähnliche klinische Bedingungen geschaffen werden, um das Spiegelbild der Ergebnisse nicht durch übermäßig hohe Kontaminationsmengen zu verzerren.

#### **4.4 Diskussion der Ergebnisse des Hauptversuches**

Die mikrobielle Kontamination von Aphereseprodukten stellt nach wie vor ein wichtiges Problem in der Transfusionsmedizin dar. Angaben über die Inzidenz kontaminierter Stammzellapheresate variieren zwischen 0,5%<sup>58)</sup>-4,5%<sup>67)</sup>

In einer abteilungsinternen Qualitätskontrolle der Medizinischen Klinik III, Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Großhadern, bei der 400 klinische Apheresate auf mikrobielle Kontamination untersucht wurden, konnte eine Kontaminationsrate von ~1,5% festgestellt werden. Im Rahmen dieser internen Untersuchung führten wir auch unsere gezielten MNC-Spenden an 39 freiwilligen gesunden Spendern durch, wobei je Apherese eine Negativkontrolle zur mikrobiologischen Begutachtung eingesandt wurde. Dabei betrug die Kontaminationsrate 0%, da sich in keinem der elektiv gespendeten Apheresate ein Erreger in der Blutkultur nachweisen ließ.

Die Wahrung der Sterilität während der Gewinnung und Weiterverarbeitung von Blutprodukten ist von immenser Bedeutung. Durch unsachgemäße Handhabung während der Zellgewinnung und Weiterverarbeitung kann eine Kontamination auftreten, wobei Keime der Hautflora und Umweltkeime das Erregerspektrum dominieren.

Eine zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht komplett abgeschlossene Studie der Abteilung über die mikrobiologische Sicherheit von autologen Blutkomponenten<sup>39)</sup>, im Rahmen derer 121 autologe Erythrozytenkonzentrate von Patienten auf mikrobiologisches Wachstum untersucht wurden, zeigte bei einer Gesamtzahl von 1210 angefertigten Blutkulturen eine Kontaminationsrate von nur 0,25% (3 positive Befunde). Dabei wurden in allen drei Fällen Keime der Hautflora isoliert (Staph.epidermidis, Staph.capitis und Staph.hominis).

Eine zweite Kultur von den als kontaminiert geltenden Originalkonzentraten fiel negativ aus. Dies spricht für eine sekundäre Kontamination der primär eingesandten Blutkulturen durch nicht steriles Arbeiten während ihrer Anfertigung.

Eine abteilungsinterne Studie über bakterielle Kontaminationsraten von Plazentablut<sup>4)</sup>, die zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht komplett abgeschlossen war, zeigte ebenfalls deutlich, dass die Kontamination von Blutprodukten in hohem Maße vom sterilen Arbeiten des Personals abhängt. Bei 15 verschiedenen Abnahmepersonen von insgesamt 117 Plazentabluten trat in unterschiedlich hohem Ausmaß eine Kontamination mit Keimen der Hautflora auf. In diesen Fällen wurde ein sogenannter sampling-error des Personals angenommen. Die Kontaminationsrate insgesamt betrug bei dieser Untersuchung 28,2% (33 von 117 Plazentabluten).

Invasive diagnostische und therapeutische Maßnahmen bei der Versorgung von schwerkranken Patienten und die Verabreichung von Zytostatika zur Mobilisierung von CD34<sup>+</sup>Stammzellen ins periphere Blut erhöhen beim zum Zeitpunkt der PBPC-Spende gesund erscheinenden autologen Spender die Gefahr einer asymptomatischen Bakteriämie.<sup>30)</sup> Wenn zu diesem Zeitpunkt eine Zytapherese durchgeführt wird, kann es zu einer Kontamination des Apheresates durch Bakterien aus der Blutbahn des Spenders kommen.

Bei der elektiven allogenen Spende ist die Kontaminationsgefahr durch endogene Erreger als wesentlich niedriger einzustufen. Eine Ausnahme bilden dabei latente endogene Bakteriämien bei Infektion eines Spenders mit *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* oder *Campylobacter jejuni*. Die Kontamination eines Blutproduktes aufgrund einer Bakteriämie des Patienten oder Spenders ist bei Einhalten der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten jedoch viel seltener als eine mikrobiologische Kontamination des Konzentrates bei der Zellgewinnung oder Weiterverarbeitung des Präparates.

Die Folgen der Transfusion eines kontaminierten Blutproduktes für den Empfänger reichen von Fieber bis hin zum Auftreten einer schweren generalisierten Infektion, Bakteriämie und septischen Schock mit tödlichem Verlauf.<sup>81)</sup> Obwohl meist nur milde Verläufe beobachtet werden und schwerwiegende Komplikationen ausbleiben, bedeutet ein mikrobiell kontaminiertes Apheresat besonders für den sich zum Zeitpunkt der Gabe von CD34+PBPC in einer ausgeprägten Neutropenie

befindlichen, infektanfälligen Empfänger eine große Gefahr, weshalb versucht werden sollte jede vermeidbare Transfusion eines kontaminierten Präparates zu umgehen.

Oftmals wird bei nachgewiesener Kontamination eines Apheresates eine weitere Apherese angestrebt. Dies bedeutet für den schwerkranken Patienten eine zusätzliche Belastung, die zum Teil mit einer erneuten Stammzellmobilisierung und Gabe von Wachstumsfaktoren verbunden ist und oftmals auch eine wiederholte Exposition mit den Risiken, Nebenwirkungen und Komplikationen einer Apherese bedeutet.

Trotz des Aufwandes kann oft ein nur minderwertiges Zellprodukt gewonnen werden, weil die Knochenmarkreserve des Patienten bereits vermindert ist. Teilweise erlaubt auch der Zustand des Patienten im Hinblick auf die Dynamik des Tumorgeschehens keinen weiteren Aufschub der Therapie.

Daher wäre ein Verfahren, das es ermöglichen könnte, ein bereits kontaminiertes Apheresat von Keimen zu befreien von großer klinischer Bedeutung.

Die Inaktivierung und das Abtöten von Mikroorganismen durch Lagerung bei Kühlschranktemperaturen oder durch Einfrieren ist hauptsächlich auf dem Gebiet der Lebensmittelforschung untersucht worden. Bei Einfrierverfahren auf diesem Gebiet wird jedoch ohne den Zusatz eines Kryoprotektivums gearbeitet, weshalb die Erreger ungeschützt den zellschädigenden Mechanismen während des Einfrier- und Auftauvorganges ausgesetzt sind.

So gelang es HAYAKAWA et al.<sup>29)</sup>, Hefen, Bakterien (*Lactobacillus brevis*, *E.coli*) und Pilze (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*) durch 24stündige Lagerung in geschlossenen wassergefüllten Behältern und Aufbau hohen Druckes bei Temperaturen im Minusbereich (-20°C) komplett zu inaktivieren.

Auch *Listerien*<sup>20)</sup>, *Vibrio parahaemolyticus*<sup>55)</sup> und *Yersinia enterocolitica*<sup>21)</sup> reagieren äußerst sensibel auf den Einfrierprozeß und werden zum Teil durch Kälte inaktiviert, bzw. sogar abgetötet.

Über eine eventuell bakterizide Wirkung der Kryokonservierung und des Wiederauftauens auf Mikroorganismen, die Stammzellpräparate häufig kontaminieren, liegen bisher keine Untersuchungen vor.

In dieser Studie wurde eine postulierte mikrobiozide Auswirkung eines Einfrier- und Auftauvorganges auf artifiziell kontaminierte MNC-Apheresate untersucht.

Dabei wurde ein Einfriermodell verwendet, das dem Verfahren der klinisch angewandten Kryokonservierung von Stammzellpräparaten in controlled-rate freezing Geräten entspricht.

Unser Interesse bei dieser Untersuchung galt uneingeschränkt klinisch bedeutenden und gefährlichen Kontaminationskeimen von Blutprodukten.

Von den fünf zur gezielten Kontamination der Zellkonzentrate verwendeten Erregern erwiesen sich alle als völlig resistent gegen die Auswirkungen des Einfrier- und Auftauvorganges sowie der tiefen Temperaturen bis zu  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Lediglich bei *Escherichia coli* konnte in drei Versuchsansätzen nach Kryokonservierung kein Wachstum von *E. coli* mehr in der Blutkultur nachgewiesen werden, wobei in allen drei Fällen die niedrige Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$  CFU/ml zur gezielten Kontamination verwendet worden war.

Da aber bei Verwendung dieser niedrigen Verdünnungsstufe bereits in fünf von zwölf Positivkontrollen kein Wachstum von *E. coli* nachzuweisen war, konnten diese Proben nicht in die Auswertung eingehen.

Man darf deshalb nicht von einer Abtötung des Erregers durch den Prozeß der Kryokonservierung und des Wiederauftauens in diesen Proben ausgehen, sondern vielmehr von negativen Positivkontrollen aufgrund von Schwierigkeiten bei der Herstellung von korrekten Keimzahlen zur gezielten Kontamination bei Verwendung dieser niedrigen Verdünnungsstufe.

*E. coli* wird zwar in der Literatur als „ein sehr einfrier-empfindlicher Keim“ („*E. coli* ... a highly freeze-sensitive Organism“)<sup>68)</sup> beschrieben, da aber bei der Verdünnungsstufe eine 10er Potenz größer wiederum in allen kryokonservierten Proben des Apheresates Wachstum von *E. coli* nachgewiesen werden konnte, ist es höchst unwahrscheinlich, dass es in den kryokonservierten Proben ohne Keimnachweis bei Verwendung der Verdünnungsstufe  $10^{-2}$ , die ohnehin nicht gewertet werden darf, zu einer Abtötung des Erregers durch den Prozeß der Kryokonservierung und des Wiederauftauens gekommen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kryokonservierung keinen ausreichend klinisch zuverlässigen bakteriziden Effekt auf Kontaminationskeime von Apheresaten hat und deshalb nicht dazu geeignet ist, eine nachträgliche Keimfreiheit in mikrobiell kontaminierten Blutprodukten zu erzielen.

#### **4.4.1 Vorstellbare Schädigungen auf zellulärer Ebene während der Kryokonservierung**

Es gibt eine Vielzahl an in der Literatur beschriebenen Schädigungsmechanismen, die auf zellulärer Ebene während eines Einfrier- und Auftauprozesses auftreten und sogar zur letalen Inaktivierung der Zellen führen können.

Dies bewog uns dazu, in dieser Studie zu überprüfen, ob man diese Schädigungsmechanismen nicht als positiven Begleiteffekt der Kryokonservierung nutzen könnte, um mikrobiologisch kontaminierte Apheresate von ihren Kontaminationskeimen zu befreien.

##### **4.4.1.1 Allgemein auftretende Zellschäden beim Einfriervorgang**

Bei Erreichen des Gefrierpunktes im Extrazellulärraum kommt es in diesem zur Eiskristallbildung und folglich zum Anstieg des osmotischen Gradienten gegenüber dem Zytoplasma und daraus resultierender Wasserverschiebung vom Intrazellulärraum in das extrazelluläre Kompartiment. Das osmotische Ungleichgewicht während dieses Prozesses bewirkt eine Dehydrierung des Intrazellulärraumes mit konsekutiver Zellschrumpfung. Die dabei entstehende hohe intrazelluläre Elektrolytenkonzentration wirkt stark zellschädigend.

Ein weiterer Faktor der Zellschädigung, der während der Kryokonservierung auftritt, liegt in der Kinetik des Einfriervorganges. Die oben beschriebenen Schädigungsmechanismen sind hauptsächlich für den Zelltod bei einem langsamen Einfriervorgang verantwortlich, wohingegen bei einem schnellen Einfriervorgang die Zeit der limitierende Faktor für die osmotische Dehydrierung ist. Durch den verbleibenden hohen Restwassergehalt im Zellinneren kommt es beim schnellen Einfrieren zur intrazellulären Eisbildung, die häufig mit einem letalen Zellschaden einhergeht.<sup>72)</sup>

Weitere oft beobachtete Schädigungsmechanismen während des Einfriervorganges, Aufbewahrens und Wiederauftauens von Zellen sind „Toxizität der Kryoprotektive“, „Kälteschock“, pH-Verschiebungen, Phasenumwandlungen und –separationen in den Membranen, Lipidperoxidation, Vesikulation, Proteindenaturierung, Entstehung freier

Radikale, thermoelastischer Streß, Versprödung, Rißbildung, Devitrifikation und Rekristallisation beim Wiedererwärmen“.<sup>72)</sup>

Durch den Einsatz von niedermolekularen Kryoprotektiven (DMSO, Glycerin) treten diese zellschädigenden Mechanismen erst bei tieferen Temperaturen auf, was die Überlebensrate der Zellen bei der Kryokonservierung deutlich erhöht.

Bei Bakterien sind molekulare Schäden, die ohne den Schutz eines Kryoprotektivums beim Einfrieren und Wiederauftauen auftreten, am besten bei E.coli erforscht.

ALUR et GRECZ<sup>1)</sup> machen in ihrer Studie für die schädigenden Mechanismen beim Einfrieren und Auftauen von E.coli Einzelstrangbrüche und DNA-Fragmentierung verantwortlich.

SOUZU et al.<sup>71)</sup> beobachteten in ihren Versuchen einfrierinduzierte, grundlegende Veränderungen in der Grundstruktur der Zellmembran von E.coli-Bakterien. Sie fanden zudem heraus, dass das Ausmaß dieser Schädigung von der Wachstumsphase der Bakterienkultur zum Zeitpunkt des Einfriervorganges abhängt: E.coli in der stationären Phase ihres Zellwachstums zeigten im Vergleich zu denen in der log-Phase eine erhöhte Resistenz gegen einfrierinduzierte Veränderungen des Lipidcharakters der Membran.

#### **4.4.1.2 Zytotoxizität von DMSO**

Das niedermolekulare Kryoprotektivum, Dimethylsulfoxid, das bei der Kryokonservierung standardgemäß eingesetzt wird, soll zwar die Viabilität von Zellen während des Prozesses der Kryokonservierung erhöhen, weist aber bei Raumtemperatur eine stark zytotoxische Wirkung auf.<sup>31)</sup> Aus diesem Grund müssen alle Schritte zur Vorbereitung eines Präparates für die Kryokonservierung auf Eis geschehen, bzw. alle dafür benötigten Substanzen auf Eis gelagert werden, um die Entfaltung des zytotoxischen Effektes von DMSO zu vermeiden.

So wäre es theoretisch vorstellbar gewesen, daß es durch einen zytotoxischen Effekt von DMSO zur Inaktivierung von Kontaminationskeimen in Blutprodukten kommen könnte. Da aber bei dieser Studie streng darauf geachtet wurde, daß alle Arbeitsschritte des Einfriermodells auf Eis geschehen, um die zytotoxische Wirkung von DMSO bei Raumtemperatur aufzuheben, ist es höchst unwahrscheinlich, daß es zur Entfaltung einer zytotoxischen Wirkung des Kryoprotektivums gegenüber den Kontaminationskeimen in den Apheresatproben gekommen ist.

#### **4.4.2. Technische Schwierigkeiten bei der Durchführung des Hauptversuches**

Schwierigkeiten, die genauen quantitativ korrekten Keimzahlen für die gezielte Kontamination der Apheresate herzustellen, sind am ehesten für die nicht verwertbare Probenreihe, die mit der Verdünnungsstufe  $10^{-2}$  gezielt kontaminiert worden war, verantwortlich.

Diese Vermutung wird durch die Positivkontrollen mit ausbleibenden Erregernachweis unterstützt.

Es gibt jedoch noch weitere mögliche Erklärungsansätze für einen negativen Keimnachweis in den kryokonservierten mit E. coli in einer Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$  CFU/ml gezielt kontaminierten Apheresatproben. Einige von ihnen werden im Anschluß diskutiert.

#### **4.4.3. Weitere vorstellbare Erklärungsansätze für einen negativen Keimnachweis in kryokonservierten Apheresatproben**

##### **4.4.3.1. Phagozytose der Bakterien durch zur Phagozytose-befähigte Zellen im Apheresat**

Phagozyten haben unter anderem die Aufgabe, körperfremde potentielle Krankheitserreger und Fremdstoffe aus dem Körper zu eliminieren. Zur Phagozytose befähigte Zellen, die im peripheren Blut zirkulieren, gelangen während der Zytapherese mit ins gewonnene Zellkonzentrat, wo sie ihre Funktion weiterhin beibehalten.

HÖGMAN et al.<sup>34)</sup> untersuchten die Funktion von Leukozyten in Buffy-coat-Präparaten und Vollblut, nachdem sie diese zuvor mit verschiedenen Bakterienspezies (CNS, Staph.aureus, E.coli, Pseudomonas aeruginosa, Propionibakterium-spp.) gezielt kontaminiert hatten. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion des Bakteriengehaltes in allen kontaminierten Proben. Fraktionen, die mit E.coli oder CNS kontaminiert worden waren, konnten sogar innerhalb von 5-24h völlig von ihren Krankheitserregern gereinigt werden. Bei den anderen Mikroorganismen konnte hingegen keine Keimfreiheit erzielt werden.

HANSEN et al.<sup>28)</sup> konnten in ihrer Studie nachweisen, dass kryokonservierte menschliche Monozyten keine Funktionseinbußen im Vergleich zu frischen, unbehandelten Phagozyten aufweisen. Morphologische Charakteristika,

Rezeptorexpression und zelluläre Funktionen blieben nach Kryokonservierung und Wiedererwärmung unverändert erhalten.

LUKOMSKA et al.<sup>51)</sup> zeigten in ihrer Untersuchung, dass 89% der Makrophagen, die auf  $-196^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt und anschließend wieder aufgetaut worden waren, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ihre Phagozytoseaktivität beibehielten und auch keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich Migration, Expression von Immunrezeptoren und der unspezifischen Zytotoxizität aufwiesen.

Diese Erkenntnisse sind ein möglicher Erklärungsansatz für das ausbleibende Wachstum von *E.coli* in den kryokonservierten Proben. Dadurch dass die Leukozyten durch die Vorbereitungen für die Kryokonservierung, mit Herstellung des DMSO-RPMI-Gemisches, Zugabe des Kryoprotektivums zu den kontaminierten Apheresatproben, den Prozeß der Kryokonservierung und des Wiederauftauens vor Anfertigung der Blutkultur eine bedeutend längere Kontaktzeit mit den Erregern im Apheresat hatten als die Positivkontrollen und auch alle Proben der zuvor durchgeführten Pilotstudie, bei denen die Blutkultur jeweils sofort nach Kontamination des Apheresates angefertigt wurden, und dass zudem als erwiesen gilt, dass die Phagozytosefunktion durch den Prozeß der Kryokonservierung kaum eingeschränkt wird, ist es möglich, dass die Monozyten in den kryokonservierten Proben vor oder nach dem Einfriervorgang die geringe Anzahl inokulierter *E.coli*-Bakterien phagozytieren konnten, wodurch diese Fraktionen bei der Blutkultur als keimfrei registriert wurden.

Bei gezielter Kontamination mit der höheren Anzahl KBE von *E.coli* ( $10^{-1}$  CFU/ml) und den anderen vier Erregern ( $10^0$ - $10^3$  CFU/ml) reichte die Phagozytoseaktivität und Kontaktzeit möglicherweise nicht mehr aus, um eine nachträgliche Keimfreiheit in den kryokonservierten Proben zu erzielen.

Auch in der Studie von HÖGMAN et al.<sup>34)</sup> konnte gezeigt werden, dass Blutprodukte, die mit *E.coli* oder CNS inokuliert wurden, höchstwahrscheinlich nur durch die Phagozytoseaktivität vollständig gereinigt werden konnten. Bei anderen Erregern hingegen konnte nur eine Reduktion der Anzahl KBE erzielt werden.

#### **4.4.3.2. Falsch negative Blutkulturen**

Der schnelle und zuverlässige Nachweis von Mikroorganismen in Blutprodukten ist oberstes Prinzip bei der Vermeidung einer transfusions-assoziierten Sepsis durch Transfusion eines mikrobiell kontaminierten Präparates.

Mit Hilfe eines am Boden der BACTEC™PLUS Aerobic/F\* und PLUS Anaerobic/F\* Kulturfläschchen angebrachten Fluoreszensensors mißt das vollautomatische BACTEC 9240 Gerät von BECTON DICKINSON die CO<sub>2</sub> Produktion in der Kultur als Indikator für mikrobielles Wachstum. Ein Computer registriert den Anstieg der Fluoreszens, der mit dem vermehrten Anfall des Stoffwechselproduktes CO<sub>2</sub> einhergeht, befundet das Fläschchen als positiv und erstellt automatisch eine Wachstumskurve des Erregers in der Probe.

Das Anfertigen von Blutkulturen hat sich in der Praxis als zuverlässige Nachweismethode für Bakterienwachstum bewährt. Im Vergleich zu anderen Methoden, wie der optischen Beurteilung des Trübheitsgrades einer Kultur, der Anfertigung einer Kultur auf Agarnährboden oder der Gramfärbung des Präparates ist sie durch eine hohe Sensitivität (94%) ausgezeichnet.<sup>68)</sup> Trotz automatischer Überwachung der Kulturflaschen mit den neuesten Geräten kann es insbesondere bei einem kleinen Inokulum von Bakterien<sup>25)</sup> oder wenn die Blutkultur nicht sofort untersucht werden kann, zur Entstehung falsch negativer Befunde kommen, d.h. das BACTEC 9240 Gerät mißt keinen CO<sub>2</sub>-Anstieg in der Probe und registriert die korrespondierenden Fläschchen als keimfrei, wohingegen eine angefertigte Subkultur derselben Fläschchen auf Agarnährboden eindeutig Keimwachstum beweist.

In der Arbeit von SHIGEI et al.<sup>68)</sup> konnte dies bei 6% der angefertigten Blutkulturen nachgewiesen werden. Wahrscheinlich muß man in dieser Studie sogar von einem noch höheren Anteil falsch negativer Blutkulturen ausgehen, da bei Anfertigung der Subkulturen keine optimalen Wachstumsbedingungen für anaerobe Erreger vorlagen.

CHAPIN et al. gaben den Anteil als falsch negativ befundeter Blutkulturen in ihrer Studie mit 6,6% an.<sup>16)</sup>

Deshalb wird vom Hersteller empfohlen, vor allem bei Blutkulturen, die nicht sofort untersucht werden können, d.h. deren Inkubationszeit  $\geq 8$ h bzw. deren Raumtemperaturexposition  $\geq 16$ h betrug, zusätzlich zur Blutkultur eine Gramfärbung und/oder eine Subkultur auf Agarplatte anzufertigen, um den schnellen und zuverlässigen Nachweis von Mikroorganismen in Blutkulturen zu optimieren, da in diesen Fällen die log-Phase des Bakterienwachstums in der Kultur bereits überschritten ist und das Gerät kaum einen CO<sub>2</sub>-Anstieg messen kann, obwohl eine massive Kontamination vorliegt.

In den wenigsten Laboratorien ist es jedoch gegenwärtig möglich dieser Empfehlung bei jeder negativen Blutkultur nachzukommen, da sie mit einem erhöhten Kosten-, Zeit-, Material- und Personalaufwand verbunden ist.<sup>68)</sup>

So wurden auch bei unserer Studie keine Subkulturen von den als BACTEC 9240-negativ befundenen, gezielt mit E.coli in einer Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$  CFU/ml kontaminierten und anschließend kryokonservierten MNC-Apheresatkulturen angefertigt, wodurch das Vorliegen von falsch negativen Befunden in diesen Fällen nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

#### **4.5. Weitere vorstellbare Verfahren zur Erzielung einer nachträglichen Keimfreiheit in einem bereits gewonnenen aber bakteriell kontaminierten Apheresat**

Die erheblichen Nachteile bei einer wiederholten Apherese aufgrund eines zuvor gewonnenen mikrobiell kontaminierten Aphereseproduktes, wie die zusätzliche Belastung des Patienten, die oft verminderte Qualität des zweiten Apheresates, sowie der Therapieaufschub und der zusätzliche erhebliche Kosten- und Zeitaufwand, haben die Suche nach Möglichkeiten zur Dekontamination eines infizierten Apheresates seit langem angetrieben. Mehrere Studien beschäftigten sich mit diesem Themenkomplex.

##### **4.5.1 Bestrahlung von Blutprodukten**

HUSTON et al.<sup>35)</sup> untersuchten 1998, inwieweit ein bakterielles Wachstum in gezielt kontaminierten Thrombozytenkonzentraten durch Bestrahlung am Herstellungstag mit Bestrahlungsdosen zwischen 0-75Gy eingeschränkt werden kann. Dabei konnte keine klinisch relevante Auswirkung der Bestrahlung nachgewiesen werden. In einer zuvor durchgeführten Pilotstudie war bei einer Strahlendosis von 100-150GY eine vollständige Inaktivierung von Bakterien in einer Bakteriensuspension erfolgt. Der Einfluß dieser hohen Strahlendosis auf das Überleben der Thrombozyten und deren Funktion blieb dabei ununtersucht.

##### **4.5.2 Einsatz von Antibiotika**

GAGNON et al.<sup>24)</sup> beschäftigten sich 1998 mit der Frage, ob eine Keimfreiheit in bakteriell kontaminierten Stammzellapheresaten durch einen Zusatz von Antibiotika möglich ist. Nach Bestimmung des Antibiogramms der für die Kontamination

verantwortlichen Erreger wurden die Proben mit dem dementsprechend ermittelten Antibiotikum in bakterizid wirkender Dosis inkubiert und anschließend erneut auf Keimwachstum untersucht. Mit Hilfe dieser Methodik gelang es GAGNON et al., eine nachträgliche Keimfreiheit in den zuvor kontaminierten Zellkonzentraten zu erzielen, wodurch dieses Verfahren als eine mögliche Alternative zu einer Wiederholung einer Zytapherese bei aufgetretener Kontamination des Produktes von den Autoren vorgeschlagen wurde.

#### **4.5.3 Photochemische Inaktivierung-Riboflavin**

GOODRICH et al.<sup>26)</sup> verwendeten Vitamin B<sub>2</sub>, Riboflavin, in Verbindung mit Lichteinwirkung zur Inaktivierung pathogener Erreger in kontaminierten Blutprodukten. Die photochemische Sterilisation erwies sich für ein breites Erregerspektrum als eine wirksame Dekontaminationsmethode von mikrobiell kontaminierten Blutprodukten.

#### **4.5.4 Lagerung der Stammzellpräparate bei Raumtemperatur vor Kryokonservierung**

Da die eigene Bakterizidie des Blutes noch einige Zeit nach Spende erhalten bleibt, wird diskutiert, inwieweit man sich dies zu Nutzen machen kann, indem man Blutprodukte nicht sofort weiterverarbeitet, sondern einen gewissen Zeitraum bei Raumtemperatur lagert, um dadurch die Sterilität geringfügig mikrobiell kontaminierter Konserven zu erreichen, ohne dabei die Qualität des Blutproduktes zu beeinträchtigen.<sup>11)</sup> Studien über den Nutzen dieser Vorgehensweise liegen vor allem bei Vollblutkonserven vor.<sup>34)64)</sup>

SANZ et al.<sup>64)</sup> kontaminierten in ihrer Untersuchung gezielt Vollblutkonserven mit Staphylokokkus epidermidis- oder E.coli-Stämmen und verarbeiteten die eine Hälfte der Präparate sofort weiter, während die andere Hälfte davon 16 Stunden lang bei 22°C gelagert wurde. Im Anschluß daran wurden die zwei Gruppen auf mikrobielles Wachstum in den Präparaten verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass in den vor Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur gelagerten Blutkonserven vermindert Bakterien nachgewiesen werden konnten, da durch die Inkubation ein Teil der Keime durch bakterizide Mechanismen eliminiert werden konnte.

Als weitere Möglichkeit zur Entfernung von Mikroorganismen aus einer Blutkonserve gilt die Leukozytendepletion. Fakultativ intrazelluläre Bakterien, wie z.B. Yersinia enterocolitica oder verschiedene Salmonella spp., die aktiv in Leukozyten eindringen

und primär nicht abgetötet werden, oder phagozytoseresistente Erreger, z.B. viele Staphylokokkus aureus- und Serratia marcescens-, aber auch Escherichia coli-Stämme, die entweder trotz Ingestion dem „Killing“ entgehen oder nicht opsoniert und damit nicht phagozytiert werden können, werden dabei mit den Leukozyten aus der Konserve entfernt.<sup>11)</sup>

Dies war auch das Ergebnis der Studie von BUCHHOLZ et al.<sup>10)</sup> zu diesem Themenkomplex.

Inwieweit es von Nutzen wäre, eine Lagerung von Stammzellpräparaten bei Raumtemperatur vor dem Prozeß der Kryokonservierung einzuführen, um in das Präparat gelangte Erreger durch die Bakterizidie des Blutes zu inaktivieren ist bislang nicht untersucht worden. Limitierender Faktor ist dabei zum einen die Viabilität der Stammzellen und zum anderen die Gefahr, der rapiden Vermehrung von Kontaminationskeimen im Apheresat bei Raumtemperatur.

Über die Lagerung von Stammzellen in nicht eingefrorenem Zustand bei Raumtemperatur oder 4°C und ihre Viabilität liegen mehrere Studien vor.

JESTICE et al.<sup>36)</sup> und BEAUJEAN et al.<sup>6)</sup> fanden heraus, dass eine Lagerung von Stammzellen in ihrer flüssigen Phase keinesfalls mit dem Verlust ihrer Viabilität einhergeht. Metabolische Veränderungen verursachen einen pH-Abfall und ein Absinken des Glukosespiegels und dazu reziproken Laktatspiegelanstieg in der Konserve, eine Inkubation der Stammzellen für 24 Stunden bei Raumtemperatur, bzw. 4°C vor dem Prozeß der Kryokonservierung ist jedoch „ohne quantitative und qualitative Beeinträchtigung des Präparates“<sup>81)</sup> möglich.

Berichte über die erfolgreiche Rekonstitution der Hämatopoese mit Stammzellen, die über einen Zeitraum von 48 Stunden Raumtemperatur oder einer Temperatur von 4°C ausgesetzt waren existieren.<sup>19)</sup>

Der Einfluß dieser veränderten Lagerbedingungen auf mikrobielle Erreger im Apheresat ist jedoch nicht erforscht. Dazu müßten weitere Studien durchgeführt und einer sorgfältigen Nutzen-Risikoabwägung unterzogen werden.

So scheiterten beispielsweise Versuche in den USA, die Laufzeit von Thrombozytenkonzentraten, die zwischen 20 und 22°C aufbewahrt werden, von fünf auf 7 Tage zu verlängern, an dem Anstieg dadurch höher kontaminierter Präparate.<sup>11)</sup>

## 5. Zusammenfassung

In einer kontrollierten prospektiven klinisch-experimentellen Untersuchung wurden 24 MNC-Apheresen an 24 freiwilligen gesunden Spendern durchgeführt, das gewonnene Zellkonzentrat portioniert und gezielt mit jeweils einem von fünf häufigen Kontaminationskeimen von Blutprodukten kontaminiert: *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylokokkus aureus*, Koagulase-negative Staphylokokken und *Pseudomonas aeruginosa*.

Dabei wurden zur Inokulation erregerabhängig sepsisähnliche Konzentrationen zwischen  $10^{-2}$ - $10^3$  KBE/ml verwendet.

Ein Teil der Proben wurde unter Zusatz von 10% DMSO kryokonserviert und in der flüssigen Phase von flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Von nicht kontaminierten unbehandelten Kontrollen, inokulierten Apheresatproben und gezielt kontaminierten und anschließend kryokonservierten und wiederaufgetauten Proben wurden Blutkulturen in BACTEC<sup>TM</sup>PLUS Aerobic/F\* und PLUS Anaerobic/F\* Kulturfläschchen angefertigt und zur Untersuchung im BACTEC 9240 Gerät von BECTON DICKINSON in die Mikrobiologie eingesandt.

Von positiven Blutkulturen wurden zur Bestätigung des Ergebnisses und zur Isolierung und Identifizierung des Keimes Subkulturen auf Blutagar angefertigt.

Die Kryokonservierung zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Viabilität von Mikroorganismen im Apheresat: alle verwertbaren, gezielt kontaminierten Versuchsansätze wiesen nach Kryokonservierung weiterhin Keimwachstum auf.

Lediglich bei *Escherichia coli* konnte, bei Verwendung einer sehr kleinen Inokulationsmenge ( $10^{-2}$  KBE/ml) zur Kontamination, in drei kryokonservierten und wiederaufgetauten Apheresaten kein Erreger mehr isoliert werden.

Da aber bei Verwendung dieser niedrigen Verdünnungsstufe bereits in fünf von zwölf Positivkontrollen kein Wachstum von *E. coli* nachzuweisen war, dürfen diese Proben nicht in die Auswertung eingehen.

Es gibt zu viele Einflußfaktoren auf den Keimnachweis in Blutkulturen, als dass hier von einer Abtötung von *E. coli* durch den Prozeß der Kryokonservierung und des Wiederauftauens ausgegangen werden darf.

Als klinisch zuverlässige Maßnahme zur nachträglichen Erzielung von Keimfreiheit bei vorliegender Kontamination eines Aphereseproduktes eignet sich die Kryokonservierung deshalb nicht.

**Liste häufig verwendeter Abkürzungen in dieser Arbeit**

KM: Knochenmark  
PBPC: peripheral blood progenitor cells  
HDT: Hochdosischemotherapie  
MNC: mononukleäre Zellen  
G-CSF: granulocyte colony stimulating factor  
SAA: schwere ablastische Anämie  
VR: Vollremission  
PR: partielle Remission  
Rez: Rezidiv  
AML: akute myeloische Leukämie  
ALL: akute lymphatische Leukämie  
CML: chronisch myeloische Leukämie  
MDS: myelodysplastisches Syndrom  
RAEB: refractory anaemia with excess of blasts  
RAEB-T: refractory anaemia with excess of blasts in transformation  
CMMoL: chronisches myelomonozytäres Lymphom  
NHL: Non-Hodgkin-Lymphom  
LK: Lymphknoten  
PNH: paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie  
SCID: severe combined immune deficiency  
RA: Rheumatoide Arthritis  
SLE: Systemischer Lupus erythematodes  
MS: Multiple Sklerose  
CNS: Koagulase-negative Staphylokokken  
CRP: C-reaktives Protein  
Diff-BB: Differentialblutbild  
RBC: red blood cells  
HGB: Hämoglobin  
HCT: Hämatokrit  
WBC: white blood cells  
PLT: plateletts  
LYM: Lymphozyten  
DMSO: Dimethylsulfoxid  
OD: optische Dichte  
KBE: Kolonie-bildende-Einheiten

## 7. Literaturverzeichnis:

- 1) Alur M.D. and Grecz N. Mechanisms of injury of *Escherichia coli* by freezing and thawing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1975;Vol. 62, No. 2:308-312
- 2) Anasetti C, Hansen JA. Effect of HLA incompatibility in marrow transplantation from unrelated and HLA mismatched related donors. *Transfus Sci* 1994;15:221-230
- 3) Atkinson K, Dodds A, Milliken S et al. Autologous blood stem cell transplantation: treatment related mortality of 2%. *Austr N Z J Med* 1995;25:483-489
- 4) Baier A, Ochmann O, Poley S, Grabein B, Strauss A, Mempel W. Residual placenta blood for autologous transfusion: detection of bacterial contamination depends on the investigated component. *Med III, Abteilung für Transfusionsmedizin, Klinikum Großhadern. Leiter Prof. Dr. W. Mempel. DGTI-Kongress 2001 (Hamburg)*
- 5) Beatti PG, Anasetti C. Marrow transplantation from donors other than HLA identical siblings. IN: Gale R, editor. *Bone marrow transplantation*, vol 4. Boston:Blackwell, 1990:677-686
- 6) Beaujean F, Pico J, Norol F, Divine M, Le Forestier C, Duedari N. Characteristics of peripheral blood progenitor cells frozen after 24 hours of liquid storage. *J Hematother* 1996;5(6):681-6
- 7) Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE et al. Identification and comparison of CD34+ cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* 1991;77:2591-2596
- 8) Borden Craig W., M.D., Hall Wendell H., M.D. Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination of blood. *New England Journal of Medicine* 1951;15:760-765
- 9) Braude AJ, Sanford JP, Bartlett JE, B.S., Mallery OT, Jr. Effects and clinical significance of bacterial contaminants in transfused blood. *J Lab Clin Med* 1952;39:902-16
- 10) Buchholz DH, AuBuchon JP, Snyder EL, Kandler R, Piscitelli V, Pickard C, Napychank P, Edberg S. Effects of white cell reduction on the resistance of blood components to bacterial multiplication. *Transfusion* 1994;34(10):852-7
- 11) Bundesärztekammer. Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Deutscher Ärzteverlag 1995
- 12) Bundesärztekammer. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Deutscher Ärzte-Verlag, Köln (2000)
- 13) Burt RK, Burns W, Hess A. Bone marrow transplantation for multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 1995;16:1-16
- 14) Cantinieaux B., Boelaert J., Hariga C. et al. Impaired neutrophil defense against *Yersinia enterocolitica* in patients with iron overload who are undergoing dialysis. *J Lab Clin Med* 1998;111:524-528
- 15) Chao NJ, Stein AS, Long GD, Negrin RS, Amylon MD, Wong RM, Forman SJ, Blume KG. Busulfan/etoposide- initial experience with a new preparatory regimen for autologous bone marrow transplantation in patients with acute nonlymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;81:319-323
- 16) Chapin, Lauderdale, T. Comparison of Bactec 9240 and Difco ESP Blood Culture Systems for detection of organisms from vials whose entry was delayed. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3): 543-549
- 17) Christophersen J. (1973) in *Temperature and Life* (edit. By Precht H., Christophersen J., Hensel H. and Larcher W.) pp. 2-59. Springer Verlag, New York

- <sup>18)</sup> Crookewit S, Raymakers R, Trilsbeck C et al. Primitive multilineage progenitor cells predominante in peripheral blood early after mobilization with high-dose cyclophosphamide and GM-CSF or G-CSF. *Leukaemia* 1994;8:2194-2199
- <sup>19)</sup> Deeg H.-J., Klingemann H.-G., Phillips G.L., Van Zant G. *A Guide to Blood and Marrow Transplantation*, 1999, 3rd edition, Springer-Verlag
- <sup>20)</sup> el-Kest SE, Marth EH. Strains and suspending media as factors affecting death and injury of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage. *J Dairy Sci* 1991;74(4):1209-13
- <sup>21)</sup> EL-Zahwahry YA, Grecz N. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by radiation and freezing. *Appl Environ Microbiol* 1981;42(3):464-8
- <sup>22)</sup> Fischer A, Landais P, Friedrich W et al. European experience of bone-marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. *Lancet* 1990;336:850-854
- <sup>23)</sup> Fountain D., Ralston M., Higgins N., Gorlin J.B., Uhl L., Wheeler C., Antin J.H., Churchill W.H. and Benjamin R.J. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion* 1997;37:585-591
- <sup>24)</sup> Gagnon JA, Porter K., Guerin D and Glück S. Bacterial decontamination of blood stem cell apheresis products. *Journal of clinical apheresis* 1998;13:103-107
- <sup>25)</sup> Gong J, Högman CF, Lundholm M and Gustafsson I. Novel microbial screening of platelet concentrates. *APMIS* 1994;102:72-78
- <sup>26)</sup> Goodrich RP. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox sanguinis* 2000;78 Suppl 2:211-5
- <sup>27)</sup> Gorin NC. Collection, manipulation and freezing of haematopoietic stem cells. *Clinics in haematology* 1986;15:19-48
- <sup>28)</sup> Hansen J-B, Halvorsen DS, Haldorsen BC, Olsen R, Sjursen H and Kierulf P. Retention of phagocytic functions in cryopreserved human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 1995;57:235-241
- <sup>29)</sup> Hayakawa K, Ueno Y, Kawamura S, Kato T, Hayashi R. Microorganism inactivation using high-pressure generation in sealed vessels under sub-zero temperature. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;50(4):415-8
- <sup>30)</sup> Henderson David K. Infections due to percutaneous intravascular devices Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th edition 2000;292:3005-3020
- <sup>31)</sup> Henon PR et al. Clinical Aspects of Autologous Blood Stem Cell Transplantations-Review of Indications, in Wunder EW, Henon PR (Eds.) *Peripheral Blood Stem Cell Autografts*. Springer-Verlag (1993);IV:209-240
- <sup>32)</sup> Herold G et al. *Innere Medizin* 2000;pp 51+726-727
- <sup>33)</sup> Hobbs JR, Hugh-Jones K, Barrett AJ et al. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone marrow transplantation. *Lancet* 1981;2:709-712
- <sup>34)</sup> Högman CF, Gong J, Eriksson L, Hambræus A, Johansson CS. White cells protect donor blood against bacterial contamination. *Transfusion* 1991;31(7):620-626
- <sup>35)</sup> Huston BM, Brecher ME, Bandarenko N. Lack of efficacy for conventional gamma irradiation of platelet concentrates to abrogate bacterial growth. *Am J Clin Pathol Jun* 1998; 109(6):743-7
- <sup>36)</sup> Jestice HK, Scott MA, Ager S, Tolliday BH and Marcus RE. Liquid storage of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1994, 14: 991-994

- <sup>37)</sup> Kapur D, Dorsky D, Feingold JM, Bona RD, Edwards RL, Aslanzadeh J, Tutschka PJ, and Bilgrami S. Incidence and outcome of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia following autologous peripherical blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2000;25:147-152
- <sup>38)</sup> Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD. Use of autologous cryopreserved peripheral stem cells to shorten marrow aplasia after high dose therapy for patients with advanced breast cancer and bone marrow metastases. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1986;5:245
- <sup>39)</sup> Khalil M, Ochmann O, Wagner B, Wittmann G, Mempel W, Mempel M. Microbiological safety of autologous blood components during storage. *Med III, Abteilung für Transfusionsmedizin, Klinikum Großhadern. Leiter Prof. Dr. W. Mempel. DGTI-Kongress 2001 (Hamburg)*
- <sup>40)</sup> Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, De Witte T, Holler E, Ansari H, for the European Group of Blood and Bone Marrow Transplantation and Working Party Chronic Leukemia: Graft versus leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995;86:2041-2050
- <sup>41)</sup> Kolbe K, Domkin D, Derigs HG, Bhakdi S, Huber C, Aulitzky WE. Infectious complications during neutropenia subsequent to peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1997;19:143-147
- <sup>42)</sup> Körbling M, Dörken B, Ho AD, Pezzutto A, Hhunstein W, Fliedner TM. Autologous transplantation of blood derived haematopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986;67:529-5332
- <sup>43)</sup> Krance R, Brenne M. BMT beats autoimmune disease. *Nature Medicine* 1998;4:153-155
- <sup>44)</sup> Kretschmer V, Sohngen D, Goddecke W, Kadar JG, Pelzer H, Prinz H, Eckle R. Biocompatibility and safety of cytopheresis. *Infusionstherapie* 1989;16 Suppl 2:10-20; discussion 28-9
- <sup>45)</sup> Krivit W, Aubourg P, Shapiro E, and Peters C. Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler's syndrome. *Current Opinion in Hematology* 1999;6:377-382
- <sup>46)</sup> Laporte JP, Douay L, Lopez M, Labopin M, Jouet JP, Lesage S, Stachowiak J, Fouillard L, Isnard F, Noel-Walter MP, Bauters F, Najman A, Gorin NC. One hundred twenty-five adult patients with primary acute leukemia autografted with marrow purged by mafosfamide: a 10-year single institution experience. *Blood* 1994;84:3810-1818
- <sup>47)</sup> Lasky LC, Smith JA, Neglia J, Ramsay NKC, Bostrom B. Treatment of children with neuroblastoma with high dose chemotherapy followed by peripheral blood stem cell hematopoietic rescue. *Int J Cell Cloning* 1989;10 (Suppl 1):155-156
- <sup>48)</sup> Link H et al. Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen-Teil II; *Med. Klin.* 1997;92:534-545
- <sup>49)</sup> Linker CA, Ries CA, Damon LE, Rugo HS, Wolf JL. Autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia using busulfan plus etoposide as a preparative regimen. *Blood* 1993;81:311-318
- <sup>50)</sup> Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P et al. Bone-marrow transplantation in patients with thalassemia. *N Engl J Med* 1990;322:417-421
- <sup>51)</sup> Lukomska B, Olszewski WL, Pawtel B, Augustynowicz S, Szmurlo W. Storage of macrophages at -196 degrees C. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1978; 26(1-6):417-22
- <sup>52)</sup> Malachowski ME, Comenzo RL, Hillyer CD et al. Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in patients with hematologic malignancies. *Transfusion* 1992;32:732-5
- <sup>53)</sup> Mollison, Engelfriet, Contreras. Infectious Agents Transmitted by Transfusion, in Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*; 9th edition 1993;16:710-785

- <sup>54)</sup> Morduchowicz Gabriel, Pitlik Silvio D., Huminer David, Alkan Michael, Drucker Moshe, Rosenfeld Joseph B. and Block Colin S. Transfusion reactions due to bacterial contamination of blood and blood products. *Reviews of Infectious Diseases* 1991;13:307-14
- <sup>55)</sup> Muntada-Garriga JM, Rodriguez-Jerez JJ, Lopez-Sabater EI, Mora-Ventura MT. Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Lett Appl Microbiol* 1995;20(4):225-7
- <sup>56)</sup> Nash RA. Hematopoietic Stem Cell Transplantation, in Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Green JP, Rodgers GM. *Wintrobe's Clinical Haematology*, Vol 1(1999):28;875-892
- <sup>57)</sup> Orlina AR, DeChristopher PJ, Conant JC, Catchatourian R, Cano P. Peripheral blood stem cell collection with reduced platelet loss to the patient/donor. *J Clin Apheresis* 1995;10(1):1-6
- <sup>58)</sup> Padley D, Koontz F, Trigg ME, Ginchrich R, Strauss RG. Bacterial contamination rates following processing of bone marrow and peripheral blood progenitor cell preparations. *Transfusion* 1996;36:53-56
- <sup>59)</sup> Passweg J, Gratwohl A, and Tyndall A. Hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune disorders. *Current Opinion in Hematology* 1999;6:400-405
- <sup>60)</sup> Pizzo PA. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. *New Engl J Med* 1993; 328 : 1323-1332
- <sup>61)</sup> Pizzo PA, Myers JD, Freifeld AG, Walsh T. Infections in cancer patients. In : DeVita VT, Hellman Stück, Rosenberg SA ( eds). *Cancer*. JB Lippincott : Philadelphia, 1993, pp 2292-2336
- <sup>62)</sup> Pollack Matthew. *Pseudomonas aeruginosa*. Mandell Gerald L., Bennett John E., Dolin Raphael. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th edition 2000;207:2310-2335
- <sup>63)</sup> Salutari Prassede, Sica Simona, Laurenti Luca, Leone Fiametta, Chiusolo Patrizia, Piccirillo Nicola, Micciulli Giulia and Leone Giuseppe. Incidence of Sepsis After Peripheral Blood Progenitor Cells Transplantation: Analysis of 86 Consecutive Hemato Oncological Patients. *Leukemia and Lymphoma*; 1998; Vol. 30:193-197
- <sup>64)</sup> Sanz C, Pereira A, Vila J, Faundez AI, Gomez J, Ordinas A. Growth of bacteria in platelet concentrates obtained from whole blood stored for 16 hours at 22 degrees C before component preparation. *Transfusion* 1997;37(3):251-4
- <sup>65)</sup> Schmitz N, Gratwohl A, Goldman JM. Allogenic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders. Current practice in Europe in 1996 and proposals for an operational classification. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:471-477
- <sup>66)</sup> Schmitz N, Linch DC, Dreger P et al ( 1996 ) Randomised trial of filgrastim-mobilized peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 347:353-357
- <sup>67)</sup> Schwella N, Zimmermann R, Heuft HG, Blasczyk R, Beyer J, Rick O, Kreißig C, Zingsem J, Eckstein R, Siegert W. Microbiologic contamination of peripheral blood stem cell autografts. *Vox Sang* 1994;67:32-35
- <sup>68)</sup> Shigei J.T., Shimabukuro J.A., Pezzlo M.T., DE LA Maza L.M., and Peterson E.M. Value of terminal subcultures for blood cultures monitored by BACTEC 9240. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;Vol.33,No.5:1385-1388
- <sup>69)</sup> Simon TL, McLeod BC. Physiology of apheresis. In McLeod BC, Price TH, Drew MJ. *Apheresis: Principles and Practice*. Bethesda, MD: AABB Press, 1997
- <sup>70)</sup> Snowden JA, Biggs JC, Brooks PM. Autologous blood stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Lancet* 1996;348:1112-1113

- <sup>71)</sup> Souza H., Sato M. and Kojima T. Changes in chemical structure and function of Escherichia coli cell membranes caused by freeze-thawing. II. Membrane lipid state and response of cells to dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1989;978:112-118
- <sup>72)</sup> Sputtek A. Kryokonservierung von Blutzellen, in Mueller-Eckhardt C (Hrsg.). *Transfusionsmedizin* (1996);8:125-135
- <sup>73)</sup> Sputtek A, Gztensohn K, Hummel K, Löliger C, Kühnl P. Zur Kryokonservierung von Blustammzellen. *J. Lab Med* 1996;20(2):70-77
- <sup>74)</sup> Stevens Alexander R., Jr., M.D., Legg James S., M.S., Henry Bernard S., Ph.D., Dille J.M., M.D., Kirby William M.M., M.D., and Finch Clement A., M.D. Fatal transfusion reactions from contamination of stored blood by cold growing bacteria. *Ann Intern Med* 1953;39:1228-39
- <sup>75)</sup> Steward CG. Stem cell transplantation for non malignant disorders, in Bailliere's *Clinical Hematology* 2000;13 No 3:343-363
- <sup>76)</sup> Storb R, Etzioni R, Anasetti C et al. Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia. *Blood* 1994;84:941-949
- <sup>77)</sup> Stroncek DF, Clay ME, Smith J, Ilstrup S, Oldham F, McCullough J. Changes in blood counts after the administration of granulocyte-colony-stimulating factor and the collection of peripheral blood stem cells from healthy donors. *Transfusion* 1996;36(7):585-9
- <sup>78)</sup> Thomas ED. The evolution of the scientific foundation of marrow transplantation based on human studies. In : Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, eds. *Bone Marrow Transplantation*. Boston, Mass:Blackwell Scientific Publications; 1994:12-15
- <sup>79)</sup> van Burik Jo-Anne, Weisdorf Daniel. Infections in Recipients of Blood and Marrow Transplantation. Mandell Gerald L., Bennett John E., Dolin Raphael. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th edition 2000;303:3136-3147
- <sup>80)</sup> Vaughan WP, Red EC, Kessinger A. High dose cyclophosphamide, thiotepa and hydroxyurea with autologous hematopoietic stem cell rescue for metastatic breast cancer, in Dicke KA, Armitage JO (eds.) *Autologous bone marrow transplantation. Fifth international symposium*. The university of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska 1992; pp 343-352
- <sup>81)</sup> Webb IJ, Coral FS, Andersen JW, Elias AD, Finberg RW, Nadler LM, Ritz J, Anderson KC. Sources and sequela of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components : implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. *Transfusion* 1996;36:782-788
- <sup>82)</sup> Wichelhaus T.A., Schäfer V., Brade V. Keimnachweis in der Blutkultur-Kontamination, Kolonisation oder Infektion. *Zentralbl Chir* 1999;124:699-702

# Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name: Andrea Blecks  
Wohnort: Ringstr. 16  
82285 Haspelmoor  
Tel.:08202/8197  
Mail: AndreaBlecks@aol.com

Geburtstag und –ort: 11.10.1976, München  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

## Schulbildung

09.1983-11.1983 Grundschole, Hattenhofen, Lkr Fürstenfeldbruck  
11.1983-10.1987 Deutsche Schule, El Paso, Texas  
10.1987-06.1996 Viscardi-Gymnasium, Fürstenfeldbruck  
06.1996 Abitur

## Hochschulbildung

11.1996-08.1998 Vorklinik/Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)  
08.1998 Ärztliche Vorprüfung  
11.1998-08.1999 1.Klinischer Studienabschnitt/LMU  
08.1999 1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11.1999-03.2002 2. Klinischer Studienabschnitt/LMU  
03.2002 2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04.2002-03.2003 Praktisches Jahr:  
1.Tertial Chirurgie/Kantonsspital Obwalden, Schweiz  
2.Tertial Neurologie/Krankenhaus München-Harlaching  
3.Tertial Innere Medizin/Krankenhaus München-Harlaching  
13.05.2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
01.06.2003 Start als AIP in der neurologischen Abteilung des städt.  
Krankenhauses München Harlaching

## Studienbegleitende Tätigkeiten

### Famulaturen:

01.03.1999-03.04.1999 Kardiologie und Intensivmedizin/Kreiskrankenhaus  
München-Pasing  
01.09.1999-30.09.1999 Onkologie/Landeskrankenanstalten Salzburg, Österreich  
10.04.2000-25.04.2000 Dermatologie/Praxisfamulatur, Fürstenfeldbruck  
07.08.2000-05.09.2000 Chirurgie/Brisbane Waters Private Hospital, WoyWoy,  
Australien  
12.02.2001-26.02.2001 Dermatologie/Praxisfamulatur, Fürstenfeldbruck

## **7. Danksagung**

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. W. Mempel für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein Dank gilt auch Dr. med. Oswin A. J. Ochmann, der mir als Betreuer stets bei der Planung und Durchführung der Arbeit mit Rat und Hilfe zur Seite stand.

Für die Unterstützung bei den klinisch-technischen Untersuchungen danke ich allen Mitarbeitern/innen der Abteilung für Transfusionsmedizin der Medizinischen Klinik III / Klinikum Großhadern.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern/innen des Max von Pettenkofer-Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie/ Klinikum Großhadern für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente.