

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Transfusionsmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski -

**Bestimmung des Restleukozytengehaltes in leukozytendepletierten
Erythrozytenkonzentraten mittels Durchflusszytometrie**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Siebert, Anne
aus Lennestadt

2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Göhde

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Transfusionsmedizin
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski –
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski
Coreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Göhde

ZUSAMMENFASSUNG

Siebert, Anne

Bestimmung des Restleukozytengehaltes in leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten mittels Durchflusszytometrie

Der Restleukozytengehalt von Erythrozytenkonzentraten gilt als eine Ursache für zahlreiche transfusionsassoziierte Komplikationen. Der Europarat schreibt in den Qualitätskontrollrichtlinien eine maximal zulässige Leukozytenkontamination von 1×10^6 Leukozyten pro Einheit vor. Dabei wird eine Mindestprüffrequenz von 1% der monatlich hergestellten Erythrozytenkonzentrate gefordert, 90% dieser untersuchten Produkte müssen den Grenzwert einhalten.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden 1520 Erythrozytenkonzentrate hinsichtlich ihres Restleukozytengehaltes mittels der durchflusszytometrischen Messung kernhaltiger Zellen mit dem CyFlow-Gerät untersucht. Bisher galt die mikroskopische Zellzählung in der Ballast-Zählkammer als so genannter „Goldstandard“. Diese in der Untersuchung angewendete durchflusszytometrische Methode ermöglicht eine automatisierte, schnellere und sensitivere Messung des Restleukozytengehaltes als konventionelle Methoden.

Insgesamt wurde in zwei Erythrozytenkonzentraten ein zu hoher Leukozytengehalt festgestellt. Die unzulässige Kontamination wurde durch einen immunologischen Nachweis von Leukozyten mittels Färbung mit dem CD45-Antikörper bestätigt. Die Qualitätskontrollrichtlinien konnten in dieser Studie eingehalten werden. Allerdings geht die Wahrscheinlichkeit, bei einer Mindestprüfung von 1% aller hergestellten Einheiten alle kontaminierten Blutprodukte aufzudecken, nahe gegen Null. Somit ist eine deutlich erhöhte Prüffrequenz für die Restleukozytenzählung von Erythrozytenkonzentraten erforderlich, um für jeden Patienten das Risiko einer Transfusionskomplikation zu minimieren und damit die Einführung einer generellen Leukozytendepletion zu rechtfertigen. Die Überprüfung aller hergestellten Erythrozytenkonzentrate wäre sinnvoll. Mit der hier vorgestellten durchflusszytometrischen Methode ist eine Routinetestung aller Erythrozytenkonzentrate praktikabel.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Hintergrund.....	1
1.1	Transfusion von (leukozytendepletierten) Erythrozytenkonzentraten	2
1.1.1	Einsatzgebiet	2
1.1.2	Indikationen.....	3
1.2	Komplikationen bei der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten	5
1.2.1	Allgemeine Komplikationen	5
1.2.2	Komplikationen durch Leukozytenkontamination.....	10
1.3	Erythrozytenkonzentrate	13
1.3.1	Leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate – Prinzipien der Herstellung	13
1.3.2	Methoden zur Bestimmung des Restleukozytengehaltes	15
1.4	Qualitätskontrollrichtlinien	18
1.5	Fragestellung und Zielsetzung.....	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Auswahl der Proben.....	23
2.2	Verarbeitung zu leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten.....	23
2.2.1	Verwendetes Vierfachbeutelssystem mit integriertem Filter	23
2.2.2	Filtration, Zentrifugation, Separation.....	24
2.3	Versuchsablauf	25
2.3.1	Probengewinnung	25
2.3.2	Vorversuche (Vergleichsmessungen).....	25
2.3.3	Hauptmessreihe: Durchflusszytometrische Messung.....	27
2.4	Präzisionskontrolle/ Kontrollmessungen.....	32
2.4.1	Sysmex - Hämatologiecounter.....	32
2.4.2	Ballast-Zählkammer.....	34
2.4.3	CD45-Messung	36

2.5	Statistik	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Vorversuche	41
3.2	Hauptmessreihe: CyFlow	45
3.2.1	Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse	46
3.2.2	Dotplotdarstellungen.....	48
3.2.3	Hypergeometrische Verteilung.....	51
3.3	Präzisionskontrolle/ Kontrollmessungen.....	52
3.3.1	Sysmex - Hämatologiecounter.....	52
3.3.2	Ballast-Zählkammer.....	55
3.3.3	CD 45-Messung.....	57
4	Diskussion	60
4.1	Auswertung der Vorversuche.....	60
4.2	Bedeutung der Restleukozytenzählung.....	63
4.3	Auswertung der Hauptmessreihe und der Kontrollmessungen.....	64
4.4	Schlussfolgerungen.....	73
5	Literaturverzeichnis.....	75
6	Lebenslauf	84
7	Danksagung	85
8	Anhang	I
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	I
8.2	Tabellenverzeichnis	II
8.3	Abkürzungsverzeichnis.....	III

1 Einleitung und Hintergrund

Ein Gebiet der Transfusionsmedizin ist die Herstellung von Blutkomponenten zur allogenen Transfusion.

Diese Blutkomponenten sind gemäß § 2 (1) AMG Arzneimittel und unterliegen immer höheren Qualitätsanforderungen [43].

Eine einschneidende Neuerung auf diesem Gebiet war die Einführung der generellen Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten in Deutschland am 1.10.2001 [77].

In mehreren anderen europäischen Ländern (z.B. England, Luxemburg, Frankreich, Irland, Portugal) existierte eine solche Anordnung bereits seit 1998, in Kanada seit 1999. Neuseeland und die USA folgten etwas später [36, 41, 42].

In der Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Institutes (Bundesoberbehörde) vom 18.08.2000 heißt es, dass ausschließlich solche Vollblute, Erythrozytenkonzentrate und Thrombozytenkonzentrate in Verkehr gebracht werden dürfen, deren Leukozytengehalt weniger als 1×10^6 pro Einheit (Blutkomponente) beträgt [77]. Die Leukozytenabreicherung soll vor der Lagerung erfolgen; als Verfahren werden die Filtration oder die Apherese empfohlen.

Eine Stellungnahme vom Arbeitskreis Blut vom 16.09.1998 gibt einen Überblick, welche Entwicklungen und Erkenntnisse zu dieser Entscheidung der Einführung einer allgemeinen Leukozytendepletion führten [86].

Die spezielle indikationsbezogene Leukozytendepletion ist bereits seit den 80er Jahren unumstritten. Dieses Vorgehen hat sich bei der Transfusion immunsupprimierter und chronisch transfusionsbedürftiger Patienten bewährt [54, 55].

Die Entwicklung von immer effektiveren und schonenden Verfahren erbringt eine gleichmäßigere Arzneimittelqualität als bei konventionellen Verfahren. Es wird möglich, Erythrozytenkonzentrate in größter Reinheit herzustellen, d.h. nicht wirksame Bestandteile wie Leukozyten zu eliminieren, da sie nicht von therapeutischem Nutzen sind [53, 70]. Zahlreiche Studien belegen, dass Leukozyten negativen Einfluss auf den Transfusionserfolg haben oder zu Komplikationen führen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass durch die Transfusion leukozytendepletierter Blutkomponenten das Risiko der HLA-Immunsierung sowie die Inzidenz von febrilen nicht-hämolytischen Transfusionsreaktionen sinken [14, 50]. Außerdem weisen viele Anzeichen darauf hin, dass die postoperative Infektionsrate niedriger ist und die Übertragung zellständiger Viren und Bakterien erschwert wird [14, 56, 99].

Die Diskussion um die potentielle Übertragung von Prionen (neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit) über Lymphozyten war ein weiterer Grund für die Einführung der Leukozytendepletion von Blutprodukten, weil diese als Vorsichtsmaßnahme angesehen wird [34, 39, 64, 67].

Die Umstellung auf leukozytendepletierete Blutkomponenten als Standardprodukte erforderte allerdings einen erheblichen Mehraufwand. Veränderungen im Produktionsprozess in Form technischer und logistischer Anpassungen wurden notwendig. Das Handling von Filtersystemen ist kompliziert. Es bedurfte daher eines speziell geschulten Personals. Zusätzlich musste ein neues Qualitätskontrollsystem ausgearbeitet werden. Für das Gesundheitssystem entstanden so erhebliche Kosten [34].

1.1 Transfusion von (leukozytendepletierten) Erythrozytenkonzentraten

Die wirksamen Bestandteile von Erythrozytenkonzentraten sind morphologisch und funktionell intakte Erythrozyten. Sie sind die Träger des Hämoglobins, das für Austausch und Transport der Atemgase in Lunge, Gewebe und Blut verantwortlich ist [21].

Bei einem normalgewichtigen Erwachsenen ohne gesteigerten Erythrozytenumsatz bewirkt die Übertragung eines Erythrozytenkonzentrates einen Anstieg des Hämoglobinwertes um etwa 1,0–1,5 g/ dl und des Hämatokritwertes um 3-4 %. Die mittlere Überlebenszeit transfundierter, kompatibler Erythrozyten liegt bei 57,5 Tagen [70].

1.1.1 Einsatzgebiet

In vielen medizinischen Fächern ist die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten eine Therapie. Es sollte jedoch bei allen Patienten mit akuter oder chronischer Anämie zunächst eine eventuell mögliche kausale Therapie angestrebt werden.

Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Transfusion von Blutkomponenten auch heute noch mit Risiken verbunden sein kann und deshalb stets eine strenge Indikationsstellung zu erfolgen hat [91].

Auf der Suche nach klar definierten Indikationen stößt man allerdings nur auf einzelne klinische Studien. Viele Leit- und Richtlinien beruhen auf klinischer Erfahrung. Als Konsens

in der Literatur findet sich die Empfehlung einer am Einzelfall orientierten Indikationsstellung.

1.1.2 Indikationen

Zahlreiche Autoren sagen aus, dass sich für die Indikation zur Erythrozytentransfusion keine absoluten und allgemein gültigen Grenzwerte für Hämoglobin oder Hämatokrit festlegen lassen. Einen so genannten „Transfusionstrigger“, den man z.B. vor zwei Jahrzehnten durchaus definierte, gibt es nicht mehr [2, 4, 95]. Zander widerlegte 1999 die seit Anfang der siebziger Jahre bestehende These, dass es einen optimalen Hämatokrit bei 30% gäbe [106].

Hébert et al. verglichen 1999 in einer randomisierten Multicenterstudie zwei Transfusionsregime. 838 Intensivpatienten wurden einer restriktiven (Transfusion ab Hb 7-9 g/ dl) oder einer liberalen (ab Hb 10-12 g/ dl) Behandlung unterzogen. Sie fanden heraus, dass die 30-Tage-Mortalität bei beiden Gruppen gleich und die postoperative Morbidität bei den liberal behandelten Patienten sogar höher war [48].

Carson et al. untersuchten 1998 die Unterschiede einer symptomorientierten und einer Grenzwert-bezogenen Transfusion (Hb-Wert) und konnten die Effektivität der ersteren herausstellen [21].

Die Bundesärztekammer empfiehlt als Konsequenz daraus in ihren Leitlinien folgendes [19]:

Akuter Blutverlust

Bei einem akuten Blutverlust hat die Aufrechterhaltung der Normovolämie oberste Priorität. Ein Verlust bis zu einem Hämatokritwert von 30 % (Hb 10,5–9,5 g/ dl) (z.B. während Operationen, bei Polytrauma) kann in der Regel allein durch eine Volumengabe gut ausgeglichen werden.

Auch bei noch größeren Blutverlusten gilt eine restriktive Indikationsstellung. Hier können herzkreislaufgesunde Patienten ohne Anzeichen für eine hypoxische Schädigung noch einen Hämatokrit von 20 % oder 7-6 g/ dl Hämoglobin tolerieren.

Bei Schwerkranken und Patienten mit klinisch relevanten kardiovaskulären Erkrankungen ist bereits ab einem Hämatokrit von 30 % eine Transfusion zu empfehlen. Als kritischer Grenzwert der absoluten Indikation zur Substitution mit Erythrozytenkonzentraten gilt ein Hämatokrit von 15%.

Chronische Anämie

Bei Patienten mit chronischer Anämie ist zu bedenken, dass diese meist daran adaptiert sind. Hier sollte möglichst eine kausale Therapie oder Alternativtherapien erwogen werden [94].

Auch bei Hämoglobinwerten von 8-7 g/ dl sind diese Patienten oft symptomfrei und erfordern keine Transfusion. Wichtigste Grundlage zur Beurteilung der Notwendigkeit einer Transfusion sollte immer das klinische Gesamtbild sein, nicht die isolierte Betrachtung der Laborwerte.

Seit der generellen Einführung des leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentrates als Standard-Erythrozytenkonzentrat, haben gesondert formulierte Empfehlungen für dessen Indikationen in der Praxis an Bedeutung verloren. Dennoch ergibt sich nach kritischer Betrachtung, welche Patientengruppen durch Studien belegt von der Leukozytendepletion besonders profitieren, folgendes Ergebnis [86]:

- Patienten nach Immunisierung gegen leukozytäre Antigene
- Patienten mit vorausgegangenen febrilen nicht-hämolytischen Transfusionsreaktionen
- Patienten mit erforderlicher Langzeittransfusion
- Stark immunsupprimierte Empfänger CMV-ungetesteter oder CMV-positiver zellulärer Blutpräparate
- Patienten mit Leukämie, aplastischer Anämie, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen sowie schweren angeborenen Immundefekten
- Patienten vor, während oder nach Organtransplantation
- Patienten vor geplanter, während oder nach autologer oder allogener Knochenmark-Stammzelltransplantation
- HIV-Patienten
- Schwangere
- Unreif Geborene
- Ungeborene bei intrauteriner Transfusion

Welche Transfusionskomplikationen im Einzelnen aus der Anwesenheit von Leukozyten resultieren können, wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.2 Komplikationen bei der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten

1.2.1 Allgemeine Komplikationen

Transfusionszwischenfälle sind durch eine Bluttransfusion beim Empfänger verursachte akute bis subakute pathophysiologische Reaktionen. Durch zahlreiche Arbeiten zur Qualitätssicherung konnte erreicht werden, dass schwerwiegende unerwünschte Wirkungen nur noch sehr selten vorkommen.

Nachfolgend ein Überblick über die wichtigsten Komplikationen bezogen auf die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten [19]:

Hämolytische Transfusionsreaktion vom Soforttyp

Sie tritt bei ABO-inkompatibler Transfusion auf. Durch Komplementaktivierung kommt es zur intravasalen Lyse. Eine häufige Ursache ist das Unterlassen des ABO-Bedside-Testes.

Die klinische Symptomatik ist sehr variabel und v.a. durch Fieber, Schock, Dyspnoe, Blutungen, disseminierte intravasale Gerinnung und Nierenversagen gekennzeichnet [25, 62].

Hämolytische Transfusionsreaktion vom verzögerten Typ

Eine bis zu 14 Tage verzögerte Hämolyse nach Transfusion kann auftreten, wenn bereits eine Sensibilisierung beim Empfänger erfolgt ist. Bei erneuter Exposition können die schon einmal gebildeten Alloantikörper, die mittlerweile erheblich abgesunken sein können, erneut anwachsen (Boostereffekt). Die Symptomatik ähnelt der hämolytischen Transfusionsreaktion vom Soforttyp [25].

Febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion (FNHTR)

Die FNHTR wird definiert als Temperaturanstieg um 1° C oder mehr in Verbindung mit einer Transfusion. Weitere häufige Symptome dabei sind Schüttelfrost, moderate Dyspnoe und Hypotension 30-60 Minuten nach Transfusion.

Heddle et al. fanden heraus, dass die FNHTR nach Transfusion von Erythrozytenkonzentraten zu 6,8 % vorkommt [50].

Als Hauptursache wird die HLA-Alloimmunisierung diskutiert [14, 17, 49]. Außerdem wurden Zytokine, die während der Lagerung des Erythrozytenkonzentrates von Leukozyten freigesetzt werden, als wichtige Einflussgröße identifiziert [14, 50].

Allergische Transfusionsreaktion

Die Ursache liegt in der Präsenz von Antikörpern im Empfängerserum, die sich gegen Plasmaproteine des Spenders richten.

Klinische Anzeichen einer allergischen Reaktion reichen von Urtikaria, Hautrötung, Pruritus bis hin zum anaphylaktischen Schock. In besonders schweren Fällen sollte ein angeborener IgA-Mangel ausgeschlossen werden.

Posttransfusionelle Purpura

Diese Komplikation tritt sehr selten auf. Sie wird durch thrombozytenspezifische Antikörper im Blut des Empfängers verursacht. Nach ca. einer Woche wird eine akute Thrombozytopenie mit Blutungsneigung auffällig.

Transfusionsassoziierte Graft versus Host-Krankheit (taGvHD)

Diese Reaktion ist ebenfalls selten und tritt in der Regel bei immunsupprimierten Patienten auf. Übertragene proliferationsfähige T-Lymphozyten wachsen im Organismus des Empfängers an und bewirken eine taGvHD. In seltenen Fällen kann eine taGvHD bei kompatibler HLA-Konstellation, v.a. bei Blutsverwandten, auch ohne Immunsuppression auftreten. Klinisch können sich u.a. nach 4-30 Tagen Fieber, ein makulopapulöses Erythem der Haut, eine generalisierte Erythrodermie, Übelkeit, Erbrechen, Panzytopenie und massive Durchfälle zeigen. Die Diagnose wird anhand der klinischen Symptome gestellt. Die Therapie erfolgt symptomatisch. Im Unterschied zur Graft versus Host-Krankheit nach Transplantation ist die Therapie mit hochdosierten Steroiden, Antithymocyte globulin (ATG) oder Cyclosporin nur in wenigen Fällen wirksam. Die Prognose einer manifesten taGvHD ist infaust. Umso wichtiger ist daher die Prophylaxe. Entscheidend sind zunächst die Identifikation der gefährdeten Patienten und das Erkennen prädestinierender klinischer Konstellationen. Da die Leukozytendepletion alleine hinsichtlich der taGVHD keine ausreichende Präventivmaßnahme darstellt, werden die für Risikopatienten bestimmten Blutkomponenten prophylaktisch mit 30 Gy bestrahlt. [19, 71, 72].

Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)

Hier sind leukozytäre Antikörper im Spenderplasma dafür verantwortlich, dass aktivierte Leukozyten in die Mikrozirkulation der Lunge austreten und ein Lungenödem bewirken. Eine rasch zunehmende Dyspnoe, Hypotonie und Fieber bis zur Beatmungspflichtigkeit sind klinische Anzeichen.

Transfusionsreaktionen durch bakterielle Kontamination

Durch Mikroorganismen aus dem Blutstrom oder von der Haut des Empfängers kann es zur Kontamination des Erythrozytenkonzentrates kommen. Septische Reaktionen durch Gabe eines solchen Erythrozytenkonzentrates ähneln der hämolytischen Transfusionsreaktion vom Soforttyp oder der FNHTR und äußern sich meist durch Fieber, Schüttelfrost, Erbrechen, Hypotonie und Tachykardie [19]. Diagnostisch ist das Beimpfen von Blutkulturen sowohl aus der transfundierten Einheit als auch aus dem Blut des Empfängers wichtig. Die Therapie sollte symptomatisch sowie gezielt antibiotisch erfolgen. Fast die Hälfte der bakteriellen Infektionen wird durch Kontamination mit *Yersinia enterocolitica* hervorgerufen, gefolgt von *Pseudomonas* Spezies und *Serratia* Spezies. Das Risiko transfusionsassoziiierter bakterieller Infektionen ist deutlich höher als das der Virusinfektionen, viele bleiben zudem unerkannt. Bakterielle Kontaminationen sind aufgrund der wärmeren Lagertemperatur in Thrombozytenkonzentraten häufiger als in Erythrozytenkonzentraten.

Transfusionsassoziierte Virusinfektionen

Werden Virämien des Spenders durch die gängigen Testverfahren nicht aufgedeckt - z.B. aufgrund der diagnostischen Lücke einer frischen Infektion, bei der noch keine Antikörperbildung stattgefunden hat - kommt es zur viralen Kontamination der Konzentrate. Das Risiko transfusionsassoziiierter Virusinfektionen konnte in den letzten Jahrzehnten deutlich reduziert werden. Seit April 1999 ist die Testung der Blutprodukte auf HCV-RNA mittels Nukleinsäure-Amplifikationstechnik (NAT), z.B. PCR vorgeschrieben; im Mai 2004 folgte die Einführung der HIV-1-NAT [80]. Dadurch konnte das diagnostische Fenster erheblich verkürzt und somit das Restrisiko der Virusinfektionen weiter reduziert werden. Das Risiko einer Übertragung von Hepatitis B durch Blutprodukte ist heute immer noch ca. zwanzigfach höher als das der Hepatitis-C- und HIV-Infektion. Daher sprach der Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit und Soziale Sicherung in einer Mitteilung vom 17.03.2005 die Empfehlung aus, neben dem Hepatitis-B-surface-Antigen (HBs-Ag)-Test alle Spenden zusätzlich auf Hepatitis-B-Core-Antigen (Anti-HBc) zu untersuchen. Damit sollen auch asymptomatische HBV-Träger erfasst werden, die eine persistierende HBV-Infektion, aber kein messbares HBsAg im Blut haben [7, 87, 90]. Im Allgemeinen treten bei einer transfusionsassoziierten Virusinfektion infektionsspezifische Krankheitszeichen nach Ablauf der Inkubationszeit auf.

Weitere allgemeine Komplikationen:

Grundsätzlich kann es auch zur *transfusionsassoziierten Parasitosen* kommen.

Die *Übertragung von Prionen* wie die neue Variante der Creutzfeldt-Jacob-Krankheit wurde bisher lediglich in Tierversuchen nachgewiesen. Beim Menschen ist aktuell das Risiko aufgrund fehlender Fallberichte schwer einzuschätzen [19, 104].

Des Weiteren kann es bei chronischem Transfusionsbedarf zur *Transfusionshämolyse* sowie bei Massivtransfusionen zur *Hypothermie* oder *Hyperkaliämie* kommen.

Eine zu schnelle Transfusion größerer Volumina kann insbesondere bei Neugeborenen, Kindern und älteren Patienten zur *Hypervolämie* führen.

Die Transfusion *hämolytischer Erythrozytenkonzentrate*, deren Zustand z.B. durch unsachgerechte Lagerung oder Erwärmung entstanden ist, können bei transfundierten Patienten schwerwiegende Gerinnungsstörungen hervorrufen.

Folgende Tabelle stellt die Häufigkeiten der oben angeführten Transfusionskomplikationen dar. Die Zahlen sind abgeleitet aus dem Jahresbericht 2000/ 2001 des britischen Registers Serious Hazards of Transfusion (SHOT) [19]:

Unerwünschte Wirkungen	Risiko je transfundierter Einheit
Hämolytische Transfusionsreaktion vom Soforttyp	
• ohne tödlichen Ausgang	1:6.000 – 1:80.000
• mit tödlichen Ausgang	1:250.000 – 1:600.000
Hämolytische Transfusionsreaktion vom verzögerten Typ	1:1.000 – 1:4.000
Febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion	< 1:200 (Erythrozytenkonzentrat)
Allergische Transfusionsreaktion	
• mit mildem Verlauf	1:33 – 1:333
• mit schwerem Verlauf	1:20.000 – 1:50.000
Posttransfusionelle Purpura	Einzelfälle
Transfusionsassoziierte Graft Versus Host-Krankheit	1:400.000 – 1:1 200.000
Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz	1:5.000 – 1:7.200
Bakterielle Kontamination	1:500.000 – 1:4.700.000 (Erythrozytenkonzentrat)
Transfusionsassoziierte Virusinfektion durch	
• HIV	< 1:10 ⁶
• HBV	1:10 ⁵ – 1:10 ⁶
• HCV	< 1:10 ⁶
Transfusionsassoziierte Parasitosen	< 1:10 ⁶
Neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit	Bisher kein Fall bekannt

Tab. 1: Häufigkeit von unerwünschten Wirkungen bei der Transfusion von Blutkomponenten

Ergänzend sollen hier noch einzelne aktuellere Zahlen der nach §22 TFG vierteljährlich erfolgenden epidemiologischen Erhebung des Robert-Koch-Institutes angefügt werden. Das Risiko für die Übertragung von HCV und HIV durch Blutkomponenten wird heute jeweils auf 1: 5 Millionen geschätzt. Die Wahrscheinlichkeit einer HBV-Übertragung wird aktuell mit 1:230.000 angegeben [7].

Die Häufigkeitsangaben zur bakteriellen Kontamination von Blutprodukten schwanken erheblich. Das Vollbild einer bakteriellen Infektion in Form einer Sepsis wird nur selten erreicht; deren Häufigkeit wird bei der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten auf 1:1 Millionen Einheiten geschätzt [29]. An anderer Stelle wird diese Häufigkeit mit 1:5.000.000 Einheiten angegeben; letale Verläufe treten zudem mit einer Häufigkeit von 1:8.000.000 Erythrozytenkonzentrateinheiten auf [101].

1.2.2 Komplikationen durch Leukozytenkontamination

Einige der in Abschnitt 1.2.1 aufgeführten Komplikationen werden durch die Anwesenheit von Leukozyten in Blutkomponenten ausgelöst [14]. Dies ist in zahlreichen Studien belegt worden und bildete u.a. die Begründung für die Einführung der generellen Leukozytendepletion. Mit der Reduktion der Leukozytenzahl in transfundierten Erythrozytenkonzentraten konnte das Risiko für folgende Reaktionen vermindert werden.

HLA-Alloimmunisierung

HLA-Moleküle (human leukocyte antigen) sind Gewebean Antigene, die auf den Zellen fast aller Gewebe vorkommen und sich besonders gut auf Leukozyten nachweisen lassen. Sie sind auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 im so genannten major histocompatibility complex (MHC) kodiert, weshalb man sie auch synonym als MHC-Moleküle bezeichnen kann. Die große Zahl von HLA-Phänotypen beruht auf der polymorphen Struktur des HLA-Gens.

Sie werden anhand der Hauptregionen im Genkomplex in Klassen unterteilt:

Klasse-I-HLA-Moleküle entsprechen den Regionen A, B und C – sie werden praktisch auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert;

Klasse-II-HLA-Moleküle entsprechen der Region D – diese werden nur auf antigenpräsentierenden Zellen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten) ausgebildet [72].

MHC-Moleküle spielen eine wichtige Rolle bei immunologischen Abwehrmechanismen und unterscheiden zwischen „Selbst“ und „Nichtselbst“. Werden Antikörper gegen fremde MHC-Antigene gebildet, spricht man von Alloimmunisierung. Dazu sind fremde Klasse I - und Klasse II - tragende Zellen notwendig, wie dies z.B. bei leukozytenhaltigen Erythrozytenkonzentraten der Fall ist. Zahlreiche Studien erläutern den positiven Einfluss der Leukozytendepletion hinsichtlich der HLA-Alloimmunisierung [13, 14, 17].

Fisher et al. untersuchten die kritische Dosis an Leukozyten in Thrombozytenkonzentraten, die Alloimmunisierung hervorruft, und legten sie bei 5×10^6 Leukozyten pro Transfusionseinheit fest [40]. Novotny et al. konnten zeigen, dass das Risiko mit mehreren vorherigen Transfusionen und auch Schwangerschaften ansteigt [74].

Die Alloimmunisierung ist Ursache der bereits o.a. **Transfusionsassoziierten Lungeninsuffizienz** sowie der **Febrilen nicht-hämolytischen Transfusionsreaktion** [14, 17]. Eine Beschreibung der ebenfalls durch Leukozyten bedingten **Transfusionsassoziierten Graft versus Host-Krankheit (ta-GvHD)** erfolgte bereits in Abschnitt 1.2.1.

Infektiosität von zellulären Blutkomponenten

Zur potentiellen Infektiosität von zellulären Blutkomponenten ist ergänzend noch folgendes anzumerken: Mit der Transfusion können über Leukozyten auch zellständige Viren wie CMV, EBV (Epstein-Barr-Virus) und HTLV-I/ II (human T-cell leukemia virus I/ II) sowie phagozytierte Bakterien übertragen werden [72].

Cytomegalievirus (CMV)

Die zellassoziierte Übertragung des Cytomegalievirus wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Mit über 90% ist die Durchseuchung mit CMV in der Bevölkerung sehr hoch [58]. Die Infektion ist für immunkompetente Menschen harmlos und bleibt latent bestehen, sie kann aber für immunsupprimierte Patienten, Feten und Neugeborene tödlich enden. Der Infektionsstatus eines Spenders wird durch den Nachweis von CMV-spezifischen IgG-Antikörpern im Serum festgestellt. Eine generelle Testung der Spender auf CMV ist nicht angezeigt. Zur Vermeidung einer CMV-Übertragung auf gefährdete Patientengruppen werden in diesen Fällen CMV-Spendertestungen durchgeführt und seronegative Spender ausgewählt. In den 90er-Jahren wurde zunehmend die Leukozytendepletion als eine weitere präventive Maßnahme der transfusionsassoziierten CMV-Infektion dargestellt. Hillyer et al. schlugen bereits 1994 vor, leukozytendepletierte Blutprodukte zu bevorzugen statt ausschließlich CMV-seronegative Produkte zu transfundieren [52]. Auch Bowden et al. zeigten 1995, dass gefilterte Blutprodukte transfusionsassoziierte CMV-Infektionen genauso gut verhindern wie die ausschließliche Verwendung von seronegativ getesteten Komponenten. Sie konnten bei ihrer Untersuchung keine signifikanten Unterschiede der Wahrscheinlichkeit einer CMV-Infektion durch seronegative Blutprodukte im Vergleich zu gefilterten feststellen (1,3 % vs. 2,4 %) [16].

Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass durch immunologische Stimuli – wie allogene Leukozyten – latente Infektionen reaktiviert werden können, was vor allem auch während einer Schwangerschaft zu Komplikationen führen kann [17]. Mazon et al. bestätigten 2000 die Gleichwertigkeit von CMV-seronegativen und leukozytendepletierten Blutprodukten. Sie konnten mit ihren Ergebnissen auch die These stützen, dass durch Leukozytendepletion die Reaktivierung latenter CMV-Infektionen reduziert wird [68].

Allerdings wird die Gleichwertigkeit von CMV-seronegativen und leukozytendepletierten Blutprodukten durchaus kontrovers diskutiert [6, 60, 76]. Eine Übersichtsarbeit von Ljungman kommt nach dem Vergleich mehrerer Studien schließlich zu dem Ergebnis, dass beide Methoden der CMV-Prävention begrenzt sind. Als Vorteil der Leukozytendepletion zur Vermeidung von CMV-Infektionen wird betont, dass dadurch gleichzeitig auch das Risiko der Übertragung anderer zellständiger Viren sowie weiterer Transfusionskomplikationen verringert werden kann. Letztendlich wird von Ljungman keine der beiden Methoden bevorzugt. Vielmehr wird auf die Bedeutung einer dritten Entwicklung hingewiesen - die Erforschung einer „in vitro-Inaktivierung“ von Pathogenen in Blutprodukten. Mittels synthetischer Psoralene oder langwelliger UVA-Strahlung werden die Nukleinsäuren der Viren und Bakterien zerstört [63].

Das Verhalten der Blutbanken hinsichtlich der CMV-Problematik ist heute unterschiedlich. In der Blutbank des Universitätsklinikums Münster werden die leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentrate für Risikopatienten zusätzlich auf CMV getestet.

Übertragung von Prionen (nvCJD)

Die Frage, ob durch Blutprodukte Prionen übertragen werden können und welche Rolle Leukozyten dabei spielen, ist nach heutigen wissenschaftlichen Erkenntnissen weiterhin offen. Allerdings konnten in den letzten Jahren in Tierexperimenten Anhaltspunkte für eine mögliche Infektiosität von Blut gewonnen werden. Zudem wurde festgestellt, dass die Infektiosität vorwiegend in Leukozyten lokalisiert ist. In Experimenten mit Schafen konnte nachgewiesen werden, dass die Gruppe der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien, zu denen auch die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) zählt, durch Transfusionen übertragbar ist. In Großbritannien sind auch beim Menschen zwei Fälle bekannt geworden, die als mögliche Übertragungen des nvCJD-Agens durch Transfusionen angesehen werden müssen. Suchtests zum Ausschluss einer Infektion mit Prionen stehen bisher nicht zur Verfügung.

Die Europäische Kommission sowie das Paul-Ehrlich-Institut gingen vorsorglich zunächst von einem „theoretischen Risiko“ der Übertragung von Prionen durch Blutprodukte aus. Die

Anordnung der generellen Leukozytendepletion zum 01.10.2001 sollte zu einem weiteren Sicherheitsgewinn in Bezug auf die Vermeidung einer Übertragung von nvCJD beitragen. Vier Jahre später gibt es Hinweise dafür, dass die Leukozytenreduktion zwar ein sinnvoller, aber nicht unbedingt zuverlässiger Schutz gegen eine nvCJD-Übertragung ist. Daher sind strenge Spenderauswahlkriterien umso wichtiger [39, 64, 81].

Immunmodulation, Postoperative Infektion

Allogene Transfusionen haben einen Einfluss auf das Immunsystem. Dieses zeigten Studien zu postoperativen Infektionen.

Jensen et al. wiesen in einer prospektiven Studie bei kolorektal operierten Patienten nach, dass die postoperative Infektionsrate bei mit leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten transfundierten Patienten signifikant niedriger war als bei Patienten, die buffy coat-arme Erythrozytenkonzentrate erhielten (12 % vs. 1 %, $p = 0,0001$) [56].

Van de Watering et al. konnten zeigen, dass sich die Leukozytenreduktion bei herzchirurgischen Patienten im Hinblick auf die Reduktion der postoperativen Sterblichkeit ebenfalls positiv auswirkt [99].

1.3 Erythrozytenkonzentrate

Es gibt verschiedene Arten von Erythrozytenkonzentraten. Sie unterscheiden sich im Wesentlichen durch den nach Herstellung verbleibenden Gehalt von Leukozyten, Thrombozyten, Plasma und additiver Lösungen.

Weil das buffy coat-freie Erythrozytenkonzentrat in Additivlösung seit dem 1.10.2001 in Deutschland nicht mehr zulässig ist, gilt das leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrat in Additivlösung als Standard-Erythrozytenkonzentrat [77]. Daneben gibt es noch gewaschene, kryokonservierte sowie bestrahlte Erythrozytenkonzentrate, die speziellen Indikationen vorbehalten sind.

1.3.1 Leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate – Prinzipien der Herstellung

Erythrozytenkonzentrate werden maschinell mittels Zellseparatoren oder aus frisch abgenommenem Vollblut gewonnen.

Zahlreiche Techniken sind zur Herstellung von leukozytendepletierten Blutkomponenten entwickelt worden. Man kann fünf grundsätzliche Methoden unterscheiden:

- Differentielle Zentrifugation
- Sedimentation
- Zell-Waschen
- Einfrieren und Auftauen
- Filtration

Die **Filtration** hat sich aufgrund der guten Ergebnisse bezüglich der umfassendsten Depletion von Leukozyten mit dem geringsten Verlust von Erythrozyten durchgesetzt. Sie ist mittlerweile zur Routinepraxis geworden [18].

In den letzten Jahren sind bei der Entwicklung von Filtern zur Leukozytendepletion große Fortschritte gemacht worden. Mittlerweile kann eine Reduktion der Leukozyten bis zu 99,99 % erreicht werden [8, 18, 84].

Die meisten Filtermedien bestehen heute aus mehreren Schichten von so genannten non-woven Polyesterfasern.

Die Filtration von Leukozyten kann als Tiefenfiltration verstanden werden, der wiederum mehrere Elementarmechanismen zugrunde liegen (Blocken, Überbrücken, Abfangen, Adhäsion). Ein alternatives Erklärungsmodell zur Tiefenfiltration ist die Unterscheidung von mechanischem (Sieben) und dem physikalisch-chemischen Zurückhalten der Leukozyten (Adhäsion) [18].

Bezüglich des Zeitpunktes der Filtration unterscheidet man folgende Varianten:

Die aktuellen Richtlinien schreiben die Filtration möglichst frühzeitig und vor Lagerung vor, dabei spricht man von **prestorage-Filtration** [19, 20, 47, 77]. Zu den Aspekten, die für eine möglichst frühzeitige Filtration sprechen, zählt z.B. die Desintegration von Leukozyten zur Freisetzung von zellständigen Viren und Bakterien, zu der es bei Lagerung kommen kann. Als günstiger Zeitpunkt für die Filtration wird der Zeitraum zwischen 6 und 24 Stunden nach Blutentnahme genannt [72].

Grundsätzlich kann die Filtration auch nach Lagerung erfolgen, sie bezeichnet man dann als **poststorage-Filtration**. Dabei unterscheidet man wiederum die Filtration noch im Labor und die Filtration direkt am Patientenbett (bedside-Filtration) [20, 42, 47].

Ein oft genannter Nachteil der mittlerweile kaum noch angewandten bedside-Filtration ist die mangelnde Möglichkeit einer standardisierten Prozess- und Qualitätskontrolle. Damit ist gemeint, dass Temperatur, Flussrate und andere beeinflussende Faktoren schwierig kontrolliert werden können [32, 34, 79, 84].

Bei der vorgeschriebenen Prestorage-Filtration unterscheidet man die **Pre-Process-** und die **In-Process-Filtration**, was sich auf die Auftrennung der Komponenten bezieht. In der Blutbank des Institutes für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Münster (UKM) erfolgt die Filtration vor Auftrennung in die Komponenten (Pre-Process-Filtration).

Der oft auch in diesem Zusammenhang verwandte Begriff der Inline-Filtration bedeutet, dass die Filtration in einem funktionell geschlossenen System erfolgt.

Folgendes Schema soll dazu einen Überblick geben:

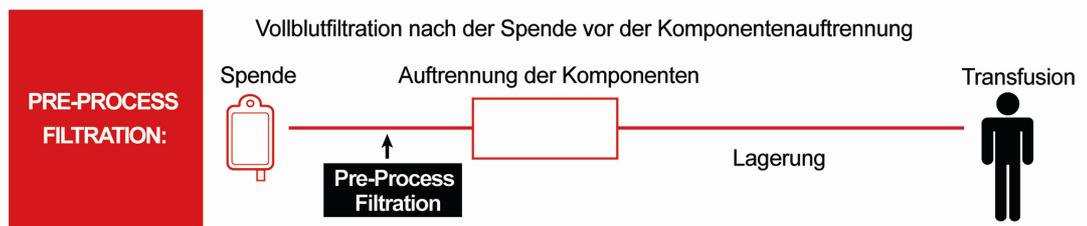


Abb. 1: Prinzip der Pre-Process-Filtration

Die Filtration des Vollblutes erfolgt nach der Spende und vor der Auftrennung in die Komponenten. Erst nach der vollständigen Verarbeitung werden die Blutprodukte bis zum Zeitpunkt der Transfusion gelagert.

Die Filtration von Vollblut ist mittlerweile soweit entwickelt, dass mehrere Studien ihre Effizienz belegen können. Es konnte gezeigt werden, dass mit den heute verwendeten Filtersystemen die Richtlinien erfüllt werden können – zum einen den Leukozytengehalt als auch die sonstige erforderliche Beschaffenheit von Erythrozytenkonzentrat und Plasma betreffend [10, 19, 20, 84, 96, 103].

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass der Vorteil im Gegensatz zur Präparation eines Buffy-coats darin liegt, dass das erhaltene Erythrozytenkonzentrat ein größeres Volumen hat und der Verlust von Erythrozyten geringer ist [85].

1.3.2 Methoden zur Bestimmung des Restleukozytengehaltes

Zur Zählung des Restleukozytengehaltes in Blutkomponenten sind verschiedene Methoden beschrieben worden.

Masse und Dzik geben in ihren jeweiligen Arbeiten einen Überblick [33, 65]. Beide erwähnen, dass bei der Entscheidung für eine Methode zum einen die Kriterien Präzision, Empfindlichkeit, Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu beachten sind. Sie heben zum anderen auch die Bedeutung der Einfachheit und schnellen Durchführbarkeit sowie die Kosten einer Methode hervor.

Masse und Dzik unterscheiden zudem zwei Zählstrategien: Erstens die Routinekontrolle mit dem Ziel zu überprüfen, ob die Werte unterhalb einer kritischen Schwelle, vorgegeben durch die Richtlinien (s.u.), liegen. Hier liegen die Zellzahlen in einem Bereich von ca. 0,5–50 Zellen/ μl . Die neuesten Filtrationstechniken ermöglichen allerdings eine Depletion bis zu Zellzahlen 100-1000fach kleiner als der genannte Bereich. Hier setzt die zweite Strategie an, die die Leistung des Filtrationsprozesses an sich validiert und absolute Zellzahlen ermitteln will.

Vor allem nachfolgend aufgeführte Methoden haben sich etabliert:

- Lichtmikroskopische Zellzählung in der Nageotte-Kammer
- Durchflusszytometrie
- Polymerase Chain Reaction = PCR
- Mikrovolumetrische Fluorimetrie

Die Zählung in der **Nageotte-Kammer** ist die am weitesten verbreitete Methode und gilt immer noch als Referenzmethode [65]. Ihr Vorteil ist die Einfachheit und die geringen Kosten. Andererseits wird der Kammerzählung vorgeworfen, dass die Ergebnisse vom jeweiligen Untersucher abhängen und eine große Routine erfordern. Zudem ist der zeitliche Aufwand von Nachteil. Eine Zählung dauert inklusive der Vorbereitung 20-30 Minuten. Dabei werden 100 μl der Probe ausgezählt, was einem Nettovolumen von 10 μl entspricht. Die Angaben bezüglich der unteren Nachweisgrenze sind unterschiedlich: Masse nennt für diese Methode eine untere Sensitivitätsgrenze von 0,2 Leukozyten/ μl [65], Dzik eine untere Nachweisgrenze von 2 Leukozyten/ μl [33].

Rebulla et al. zeigten 1994 in einer Multicenterstudie, dass die Zählung in der Nageotte-Kammer im Bereich > 1 Leukozyt/ μl mit der Durchflusszytometrie vergleichbare Ergebnisse erzielt und ermittelten eine untere Nachweisgrenze für die Nageotte-Kammer von 1 Leukozyt/ μl [82].

Seit Mitte der 80er-Jahre kam immer mehr die **Durchflusszytometrie** zur Restleukozytenzählung ins Gespräch. Diese unterliegt bis heute einer stetigen Entwicklung. Mittlerweile ist es gelungen, sogar Subpopulationen von Leukozyten zu identifizieren. Das Prinzip der Durchflusszytometrie wird an anderer Stelle beschrieben.

Als Nachteil gilt, dass der technische Aufwand groß ist und es bis vor kurzem keinen Kalibrierungsstandard gab [65]. Eine geeignete Kontrolle wie z.B. BD LeucoCOUNT RBC Control (Becton-Dickinson, USA) wurde kürzlich erst entwickelt. Je nach Apparatur können bei der Durchflusszytometrie aber größere Probenvolumina von bis zu einem Milliliter und

mehr ausgezählt werden. Das hier verwendete CyFlow-Durchflusszytometer enthält eine Zählkammer von 500 μl , was einem Nettoprobevolumen von 50 μl und damit dem Fünffachen bei der Ballast-Kammerzählung entspricht. Zudem dauert eine Messung inklusive Probenvorbereitung nur ca. 3 Minuten.

Masse nennt für die Durchflusszytometrie die gleiche untere Sensitivitätsgrenze wie für die Zählung in der Nageotte-Kammer von 0,2 Leukozyten/ μl [65].

Die erste Multicenterstudie der BEST Working Party (Rebulla et al., 1994) zeigte im Präzisionsbereich $< 0,1$ Zellen/ μl für die Durchflusszytometrie bessere Ergebnisse als für die Kammerzählung. Es wird eine untere Nachweisgrenze von 0,1 Leukozyten/ μl genannt. Allerdings schlug man die Durchflusszytometrie damals eher als Methode vor, Filterleistungen zu überprüfen anstatt zur Routinequalitätskontrolle zu verwenden [82]. Dies änderte sich im Laufe der Zeit. Immer mehr wurde sie als Alternative zur mikroskopischen Zellzählung deklariert [5, 22, 35, 73].

Eine weitere Methode ist die DNA-basierte quantitative **Polymerase-Kettenreaktion** (PCR), bei der von Lee et al. HLA DQ α als Ziel-DNA gewählt wurde [61]. Diese Methode ist sehr aufwendig, bietet allerdings den Vorteil, dass bei der Zählung auch nicht mehr intakte Leukozyten berücksichtigt werden und sich das Risiko der Unterschätzung des tatsächlichen Leukozytenrestgehaltes verringert. Gleichzeitig ist aber das Ausmaß der exponentiellen Amplifikation schwer zu kontrollieren und die Extrapolation zur Originalmenge an Ziel-DNA ebenfalls schwierig. Bisher sind keine Multicenterstudien mit dieser Methode durchgeführt worden [33].

Unter den von Masse beschriebenen Methoden erhält die PCR mit 0,02 Zellen/ μl die niedrigste untere Nachweisgrenze [65].

Die **volumetrische Kapillarfluorimetrie** wurde 1995 als neue Methode zur Restleukozytenzählung auf dem Markt eingeführt. Anders als bei der Durchflusszytometrie, bei der die Probe einen fixierten Laserstrahl passiert, wird bei der Kapillarfluorimetrie die fixierte Probe von einem mobilen Laserstrahl abgerastert. Ähnlich der Durchflusszytometrie werden fluoreszierende Partikel erfasst und gezählt. Aufgrund einer automatischen, software-gesteuerten Auswertung über ein bildanalysierendes System ist sie wie die Durchflusszytometrie von individuellen Fehlern unabhängiger als die Kammerzählung [33]. Seghatchian et al. konnten die von Dietz et al. bereits 1996 vorgestellte Methode 2001 in einer Multicenterstudie als vergleichbare Alternative zur Durchflusszytometrie darstellen [27, 89].

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Vor- und Nachteile der Methoden zur Restleukozytenzählung in Erythrozytenkonzentraten:

Methoden	Vorteile	Nachteile
Nageotte-Kammer [65, 82]	- einfache Methode - kostengünstig	- zeitlich aufwendig - subjektive Methode (von Untersucher abhängig) - wenig empfindlich
Durchflusszytometrie [5, 22, 35, 65, 73, 82]	- objektiv - größere Nettoproben-Volumina - schnelle Messung - kostengünstig	- technisch aufwendig
Polymerase Kettenreaktion (PCR) [33, 65]	- objektiv - Berücksichtigung auch nicht mehr intakter Leukozyten	- sehr aufwendig - bisher keine Multicenterstudien - hohe Kosten
Volumetrische Kapillarfluorimetrie [27, 33, 89]	- objektiv	- technisch aufwendig - hohe Kosten

Tab. 2: Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden zur Restleukozytenzählung

1.4 Qualitätskontrollrichtlinien

Die Einführung der universellen Leukozytendepletion als neuer Standard erforderte eine angepasste Prozess- und Qualitätskontrolle, um den klinischen Anforderungen und nationalen Standards gerecht zu werden.

Es mussten neue Richtlinien entwickelt werden, die gewährleisten, dass die produzierten Erythrozytenkonzentrate einerseits die adäquate Menge an therapeutischen Blutzellen enthalten sowie andererseits den entsprechend vorgeschriebenen Grenzwert an Restleukozyten einhalten.

Die transfusionsmedizinische Therapie unterliegt in Deutschland zahlreichen gesetzlichen Regelungen, Richtlinien, Verordnungen und Leitlinien.

Bei der Herstellung von Blutprodukten ist neben dem Arzneimittelgesetz, die Betriebsverordnung für pharmazeutische Unternehmer (Pharmabetriebverordnung) und das Medizinproduktgesetz (MPG) zu beachten [11, 43, 69]. Die Bundesärztekammer und das Paul-Ehrlich Institut (PEI) beschreiben ihre Anforderungen an deutsche Hersteller in den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ [20].

Weiterhin bilden auch die Good manufacturing practices (GMP) und die Good laboratory practices (GLP) der Europäischen Gemeinschaft eine Grundlage für die Herstellung und den Umgang mit Blutprodukten [37, 38].

Bei der Anwendung von Blutprodukten ist dem Transfusionsgesetz Folge zu leisten [44]. Ebenso spielen auch die Richtlinien sowie Leitlinien der Bundesärztekammer eine wichtige Rolle [19, 20].

Auf europäischer Ebene gelten die Empfehlungen des Council of Europe [47].

Ergänzend sind für die USA noch die Richtlinien zu erwähnen, die die Food and Drug Administration (FDA) vorschreibt [41, 42].

Die beiden folgenden Tabellen zeigen klinische Parameter, die ein leukozytendepletiertes Erythrozytenkonzentrat laut Richtlinien der Bundesärztekammer erfüllen muss [20].

<i>Prüfparameter</i>	<i>Prüfkriterium</i>	<i>Prüfungszeitpunkt</i>
Volumen	Abhängig von Entnahmeevolumen, wird vom Hersteller festgelegt	nach Herstellung
Hämatokrit	50-70 %	nach Herstellung und am Ende der ermittelten Haltbarkeit
Gesamt-Hb	≥ 40g/ Einheit	nach Herstellung und am Ende der ermittelten Haltbarkeit
Hämolyserate	< 0,8 % Hämolysen der Erythrozytenmasse	am Ende der ermittelten Haltbarkeit
Visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt, keine sichtbare Hämolysen	nach Herstellung und am Ende der ermittelten Haltbarkeit
Sterilität	Steril	am Ende der ermittelten Haltbarkeit

Tab. 3: Von der Bundesärztekammer geforderte klinische Parameter eines Erythrozytenkonzentrates

Die anschließende Übersicht zeigt weitere wichtige Parameter und vergleicht die unterschiedlichen nationalen Standards:

	Bundesärztekammer und PEI [20]	Europarat [47]	FDA (USA) 1996 [42]	FDA (USA) 2001 [41]
Restleukozytengehalt	$< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit	$< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit	$< 5 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit	$< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit
Geforderter Mindestanteil Erythrozytenkonzentrate, die Grenzwert (s.o.) einhalten sollen	90 %	90 %	100 %	95 %
Monatliche Prüffrequenz	1 % der hergestellten Einheiten, mind. 4 Einheiten	1 % der hergestellten Einheiten, mind. 4 Einheiten	1 % der hergestellten Einheiten, mind. 4 Einheiten	anfänglich 60 Einheiten in Folge, dann mind. 20 Einheiten/ Monat

Tab. 4: Vergleich verschiedener Richtlinien zur Qualitätskontrolle

In den USA erfolgte inzwischen eine Änderung der Richtlinien: Während 1996 noch die Einhaltung eines Grenzwertes von $< 5 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit galt, wurde dieser 2001 der europäischen Norm angeglichen [41, 42].

Innerhalb Europas ist als Beispiel noch Frankreich zu erwähnen. Dort wurde die universelle Leukozytendepletion bereits 1998 eingeführt. Der Grenzwert für den Restleukozytengehalt entspricht den europäischen Richtlinien ($< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit); ein Unterschied besteht im Toleranzbereich: Hier müssen 97 % der überprüften Einheiten den Grenzwert einhalten [24].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die mikroskopische Zellzählung in der Nageotte-Kammer gilt immer noch als so genannter „Goldstandard“ zur Restleukozytenzählung - weil sie einfach und vor allem kostengünstig ist [66, 82]. Die Nachteile dieser Methode: Sie gilt als subjektiv, zeitaufwendig und als Verfahren mit großer Variabilität sowie geringer Sensitivität.

Automatische Zählmethoden sind demgegenüber bereits positiv überprüft, gelten aber noch als zu teuer und kompliziert im Verfahren [27, 35, 73, 89].

Cassens et al. validierten die in dieser Untersuchung angewendete Methode der volumetrischen Durchflusszytometrie und erklärten sie als günstige und einfache Alternative [22]. In einer Dissertation am Institut für Strahlenbiologie der Universitätsklinik Münster konnte diese Methode bereits erfolgreich zur Überprüfung des Restleukozytengehaltes von Thrombozytenkonzentraten angewandt werden [15].

Diese Arbeit nutzt ebenfalls die Methode der volumetrischen Durchflusszytometrie, um prospektiv 1520 leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate auf ihren Restleukozytengehalt hin zu untersuchen. Über mehrere Monate flossen sämtliche in der Routine des Instituts für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Münster hergestellten Erythrozytenkonzentrate in diese Untersuchung ein.

Aufgabe dieser Studie ist es, folgende Fragen zu klären:

1. In Vorversuchen soll zunächst der Frage nachgegangen werden, ob die Probeentnahme aus dem Schlauchsegment eines Erythrozytenkonzentrates - hier im Hinblick auf dessen Restleukozytengehalt - repräsentativ für den Beutelinhalt ist. Für eine mögliche Weiterverwendung des Erythrozytenkonzentrates ist zwar grundsätzlich nur die Entnahme der Blutprobe aus einem Schlauchsegment zulässig, dennoch ist dies eine wichtige Frage, zu welcher bislang keine Untersuchungen vorliegen.
2. Eine zentrale Frage dieser Arbeit ist, ob das hier angewendete Verfahren auch für den routinemäßigen Einsatz großer Analyseserien zur Qualitätskontrolle leukozytendepletierter Erythrozytenkonzentrate geeignet ist. Dzik et al. schlugen eine große Anzahl von Messungen bereits 2000 vor, um sicher zu stellen, dass ein hoher Anteil die Standards von FDA und Europarat erfüllt [35]. In welcher

Größenordnung die Versagerrate wirklich liegt, untersuchten auch Adams et al. mit einer Computer-Simulation [1]. Auch sie forderten klinische Studien mit einer großen Anzahl von Blutkomponenten.

3. Des Weiteren soll diese Arbeit die bestehenden Richtlinien zur Qualitätskontrolle hinterfragen: Ist eine Überprüfung von mindestens 1 % der hergestellten leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentrate ausreichend, um vermeintliche Kontaminationen zu erfassen? Ist zudem ein Toleranzbereich von 10 % der kontrollierten Konzentrate tragbar, die den Grenzwert dabei noch überschreiten dürfen? Mit welcher Wahrscheinlichkeit werden leukozytenkontaminierte Erythrozytenkonzentrate im Rahmen der Qualitätskontrolle gemäß den Richtlinienanforderungen entdeckt? Besteht die Notwendigkeit der Leukozytenzählung aller hergestellten Einheiten?

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl der Proben

In dieser Arbeit wurden prospektiv 1520 leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate auf ihren Restleukozytengehalt mittels Durchflusszytometrie untersucht. Alle innerhalb der Routineblutspende gewonnenen Erythrozytenkonzentrate flossen über mehrere Monate solange in die Untersuchung ein, bis die im Versuchsprotokoll festgelegte Anzahl von 1500 Präparaten erreicht war.

2.2 Verarbeitung zu leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten

Nach den Richtlinien zur Hämotherapie wurden die Vollblutpräparate innerhalb von 24 Stunden in ihre Komponenten (Buffy coat, Plasma und Erythrozyten) aufgetrennt [20]. Von jedem Spender wurden 450 ml Vollblut entnommen und in ein geschlossenes Beutelsystem mit integriertem Filter überführt. Durch das Filter wurden die Leukozyten im Vollblutpräparat entfernt.

2.2.1 Verwendetes Vierfachbeutelsystem mit integriertem Filter

Bei dem verwendeten Beutelsystem Leukotrap WB [Firma Pall Newquay, Cornwall, UK (REF 788-114BE)] handelt es sich um ein Pre-Process Filtersystem zur Entfernung von Leukozyten aus Vollblut.

Das System besteht aus folgenden Komponenten (s. Abb. 2):

- Primär-Beutel mit Entnahmenadel zur Aufnahme von 450 ml Vollblut; er enthält 63 ml Stabilisator (CPD, s. u.) zur Antikoagulation
- Integriertes Filter (WBF-2-Filter) mit Transfer-Beutel und Blutrückgewinnungsschleife
- Erythrozytenkonzentrat-Beutel mit 100 ml Additivlösung (SAG-Mannitol, s. u.) als Stabilisator
- Plasma-Beutel zur Aufnahme des Plasmas

100 ml Stabilisatorlösung CPD enthalten: Citronensäure-Monohydrat 0,327 g; Natriumcitrat-Dihydrat 2,63 g; Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 0,251 g; Glucose-Monohydrat 2,55 g; Aqua ad injectabilia ad 100 ml.

100 ml SAG-Mannitol enthalten: Natriumchlorid 0,877 g; Glucose-Monohydrat 0,9 g; Adenin 0,017 g; Mannitol 0,525 g; Aqua ad injectabilia ad 100 ml.

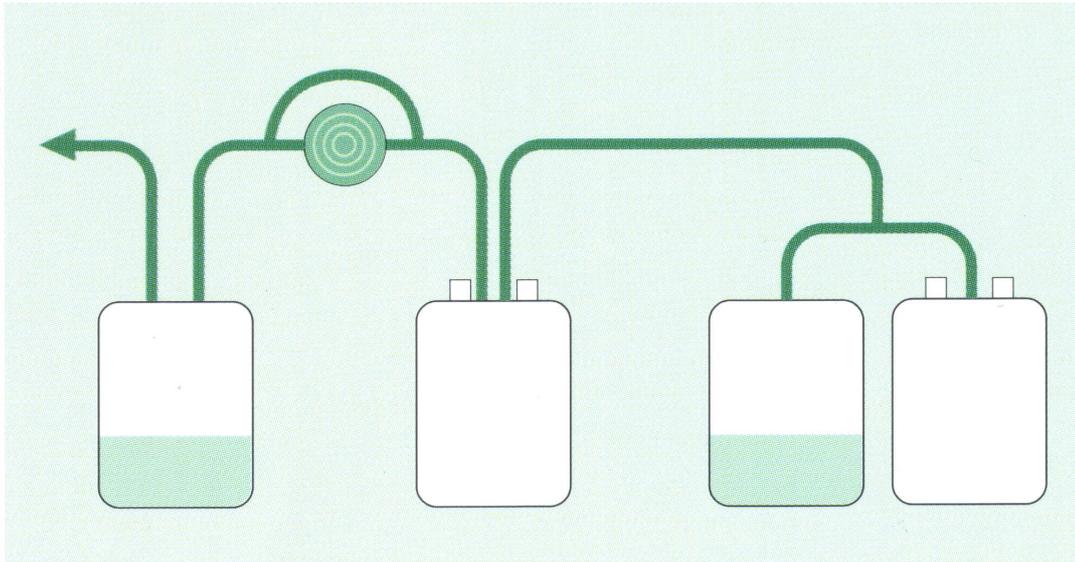


Abb. 2: Verwendetes Vierfachbeutelensystem mit integriertem Filter

Vom Primärbeutel (links), der während der Spende gefüllt wird, fließt das Vollblut über ein integriertes Filter in den Transferbeutel (Mitte). Dieser wird anschließend zentrifugiert und mittels eines Separators in einen Erythrozytenkonzentrat- und Plasmabeutel aufgetrennt (rechts).

2.2.2 Filtration, Zentrifugation, Separation

Nach der festgelegten Ruhezeit vor der Weiterverarbeitung und Filtration wurde das gesamte mit Vollblut gefüllte Beutelsystem gewogen und das Gewicht – wie alle anderen Daten der Verarbeitung – auf dem Herstellungsprotokoll des einzelnen Erythrozytenkonzentrates dokumentiert.

Jedes System war mit einer Strichcodenummer versehen, die zu jeder Zeit eine Identifizierung jedes einzelnen Blutproduktes sowie Informationen über den Spender ermöglichte.

Die Herstellung erfolgte gemäß Herstellerangaben und Standardarbeitsanweisung des Institutes für Transfusionsmedizin des UKM.

Der nach der Filtration gefüllte Transferbeutel wurde bei 3200 Umdrehungen/Minute für 20 Minuten (g-Zahl = 3253) zentrifugiert (Zentrifugen Roto/ Silenta RP und RS, Hettlich, Tuttlingen, Deutschland).

Die Separation des zentrifugierten Beutels erfolgte im Biotrans-Separator (Biotrans, Dreieich, Deutschland) mit eingestelltem Restvolumen von 50 ml.

Anschließend wurden das erhaltene leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrat und das Plasma gewogen. Dieses so genannte Bruttogewicht wurde ebenfalls dokumentiert. Das Nettovolumen wurde unter Berücksichtigung des Beutelleergewichtes von 41 g und der spezifischen Dichte des Erythrozytenkonzentrates von 1,064 g [72] folgendermaßen berechnet:

$$\left(\frac{\text{Bruttogewicht [g]} - 41 \text{ g}}{1,064 \text{ g/ml}} \right) = \text{Nettovolumen [ml]}$$

Erythrozytenkonzentrate außerhalb der vom Hersteller festgelegten Spezifikation für das Nettovolumen flossen nicht in die Untersuchung ein.

Das hergestellte Erythrozytenkonzentrat wurde bei 4°C +/- 2°C gelagert und war 42 Tage haltbar.

2.3 Versuchsablauf

2.3.1 Probengewinnung

Die sterile Probengewinnung erfolgte über einen Probeentnahmeschlauch. Der Probeentnahmeschlauch wurde zehnmal ausgestrichen (Ausstreichzange, Baxter, Belgien), wobei nach jedem Ausstreichvorgang der gesamte Beutel in der Hand zwei- bis dreimal geschwenkt wurde, um eine gute Durchmischung des Inhaltes zu gewährleisten. Anschließend wurde mittels Schweißverfahren ein steriles Segment aus dem Schlauch abgetrennt. Dessen Schlauchinhalt, ca. 3-4 ml, wurde unter Berücksichtigung der Strichcode-Nummer in Proberöhrchen umgefüllt. Bis zu Beginn der Messung, die jeweils unmittelbar nach der Herstellung erfolgte, wurden die Proben bei 4 °C gekühlt.

2.3.2 Vorversuche (Vergleichsmessungen)

Über das Schlauchsegment wurde ein repräsentatives Aliquot entnommen, die Übereinstimmung des Inhaltes wurde über den Restleukozytengehalt bestimmt. Dabei erfolgte die Probenentnahme aus dem Schlauchsegment wie oben beschrieben. Zur Probengewinnung aus dem Beutel wurde ein steriles Anstechset genutzt und die Probe (3-

4ml) in ein Proberöhrchen überführt. Das Anstechset bestand aus einem Verbindungsdorn mit Injektionsanschluss (Baxter, Belgien, REF RMC1401), einer Kanüle (Neolus, 18G; 1,2mm, Terumo, Ref NN-1838S359) und einer 20ml-Einmalspritze (Braun, Melsungen, Ref 302030). Dabei wurden nur gesperrte Produkte verwendet, die nicht mehr zur Ausgabe an Patienten bestimmt waren.

Folgende Vorversuche wurden durchgeführt:

- I. Es wurden 20 leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate, deren Haltbarkeitsdatum überschritten war (älter als 42 Tage) ausgewählt, von denen ca. 3-4 ml jeweils aus Schlauchsegment (zehnmal ausgestrichen) und Beutel gewonnen wurden. Der Restleukozytengehalt wurde vierfach per Durchflusszytometer (CyFlow, Partec, Münster) und mittels zweifacher Ballast-Kammerzählung bestimmt.
- II. Im zweiten Schritt wurden acht frisch verarbeitete Erythrozytenkonzentrate untersucht, die wegen Über- oder Unterschreiten der Spezifikation für das Nettovolumen zu verwerfen waren. Hier erfolgte ebenfalls vierfach durchflusszytometrisch und zweifach durch Kammerzählung die Prüfung des Leukozytengehaltes.
- III. Anschließend wurden zehn frische Erythrozytenkonzentrate untersucht. Bei ihrer Verarbeitung wurde der Schritt der Filtration ausgelassen, indem der Filter vom Beutelsystem abgeschweißt und so umgangen wurde. Hierbei wurde eine Probe aus einem Schlauchsegment, welches nur fünfmal ausgestrichen wurde, eine Probe aus einem zehnmal ausgestrichenen Segment sowie eine Probe aus dem Beutel entnommen. Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte diesmal jeweils fünffach per Durchflusszytometer und per automatischen Hämatologie-Zellzählgerät (Sysmex, K-1000, Kobe, Japan).

Die unterschiedlichen Messmethoden und die jeweilige Präparation der Proben wird unter Punkt 2.3.3 sowie 2.4 beschrieben.

2.3.3 Hauptmessreihe: Durchflusszytometrische Messung

Aufbau und Prinzip des Durchflusszytometers

Ein Durchflusszytometer ist ein optisches Meßsystem zum Zählen und Analysieren von Zellen oder Partikeln. Die Ergebnisse beruhen auf einer gleichzeitigen Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter jeder einzelnen Zelle. Eine Analyse besteht aus der Summe vieler schnell aufeinander folgender Einzelmessungen. Es sind Zellen jeder Herkunft geeignet, sofern sie in einer Suspension vorliegen.

Die wichtigsten Elemente eines Durchflusszytometers sind:

- Die Messküvette, in der die Zellen - wie an einer Perlschnur aufgereiht - an der Optik vorbeigeführt und angeregt werden.
- Das optische System - bestehend aus einem Anregungsteil (Laser- oder Quecksilber-Dampflampe) und einem Detektionsteil. Die Fluoreszenzen werden über verschiedene optische Elemente (Teilerkanten und Filter) den unterschiedlichen Detektoren (Photomultipliern) zugeführt.
- Der Teil der Signalverarbeitung; hier werden die Fluoreszenzsignale digitalisiert, über einen Computer verarbeitet und mit einer speziellen Software (FloMax, Partec, Münster, Deutschland) analysiert.

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Durchflusszytometer besitzt im Gegensatz zu anderen Durchflusszytometern die Möglichkeit, die Konzentration der gesuchten Zellen oder Partikel über eine Volumenmessung zu bestimmen. Dies hat den Vorteil, dass keine Referenzmessung durch einen Hämatologiecounter oder über Referenzpartikel erfolgen muss, wie sie bei anderen Durchflusszytometern erforderlich ist. Das Gerät hat hierzu eine besondere Probenhalterung (s. Abb. 3), die garantiert, dass ein genau definiertes Probenvolumen gemessen wird. Zwei unterschiedlich lange Elektroden sorgen für ein konstantes Messvolumen von 500 μl . Die Probe wird über ein Schlauchsystem zur Messküvette geleitet, hier von Hüllstrom umschlossen und zum Messbereich mitgeführt. Aufgrund der spezifischen Geometrie der Küvette kommt es zu einem sehr schmalen, laminar fließenden Probenstrom (hydrodynamische Fokussierung), wobei Probe und Hüllstrom nicht vermischt werden.

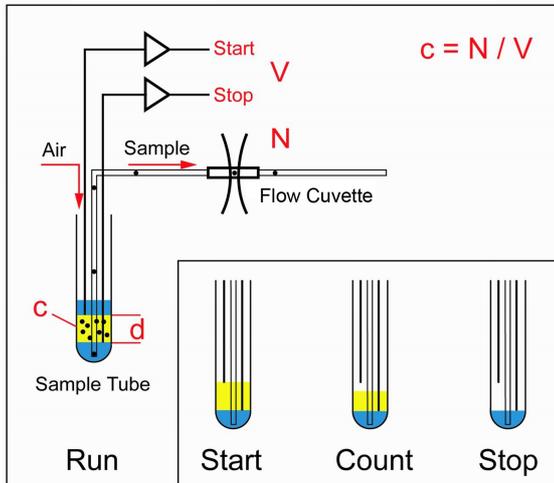


Abb. 3: Volumetrisches Messprinzip

Während der Messung nimmt das Probenvolumen in Probenröhrchen kontinuierlich ab. Erreicht der Meniskus das Ende der oberen Elektrode, beginnt das Gerät mit der Zählung, bei Erreichen des Endes der unteren Elektrode wird die Messung beendet. Die Volumendifferenz zwischen oberer und unterer Elektrode entspricht $500 \mu\text{l}$ mit einer Abweichung von 2% (Angabe des Herstellers).

Die markierten Zellen passieren nun einzeln nacheinander den Messbereich und werden dort mit Laser oder UV-Licht angeregt, abhängig von der Ausstattung des Gerätes und von der Anregungswellenlänge des Fluorochroms. Die einzelnen Zellen leuchten nun in einer, für das Fluorochrom charakteristischen Wellenlänge. Die Intensität der Fluoreszenz ist von der Konzentration des Zellinhaltsstoffes abhängig. Die Fluoreszenzsignale werden durch unterschiedliche Filter, Blenden und Teilerkanten auf verschiedene Photomultiplier gelenkt und als digitalisierte Signale von der Software des Computers (FloMax, Version 2.3, Partec, Münster, Deutschland) verarbeitet. Die Rohdaten werden als FCS-File gespeichert und graphisch in Form eines Histogramms dargestellt. Je nach Zahl der aktiven Photomultiplier können die Signale als Ein- oder Zweiparameter-Histogramm dargestellt werden.

Einparameter-Histogramm

Die eingehenden Messsignale werden entsprechend ihrer Intensität, und damit der Menge des interessierenden Zellinhaltsstoffes, einer von 1024 Größenklassen zugeordnet. Diese Größenklassen entsprechen den Kanälen, die auf der Abszisse des Histogramms aufgetragen sind. Die einzelnen Messwerte fallen gleichsam wie Kugeln in das ihnen jeweilig entsprechende Register (Größenklasse). Der Kanalinhalt, d.h. die jeweilige Anzahl gezählter Zellen der einzelnen Größenklasse, wird auf der Ordinate aufgetragen. Dadurch entstehen so genannte „Peaks“. Alle zu einem Peak gehörenden Zellen haben die gleiche Menge an gemessenem Zellinhaltsstoff.

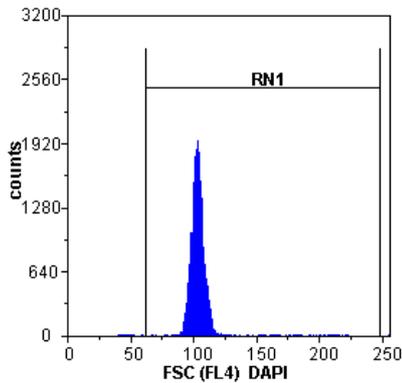


Abb. 4: Einparameter-Histogramm einer EDTA-Vollblutprobe

Entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität sind DAPI-gefärbte Leukozyten auf der Abszisse in 1024 Kanäle eingeordnet (hier ein Ausschnitt der Kanäle 0 bis 250). Die Zahl der Leukozyten mit identischer Fluoreszenz gibt die Ordinate an. Der interessierende Fluoreszenzbereich kann über Auswertefenster (Gate RN1) selektiert werden.

Zweiparameter-Histogramm

Da die DAPI-Fluoreszenz bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen werden kann, erlaubt dies die Aufnahme eines begrenzten Spektrums und die Wiedergabe der Messung in einem Zweiparameter-Histogramm, bei dem die Signale als Punkte in einem Histogramm dargestellt werden. Diese Art der Auswertung ermöglicht es, besser zwischen Zellsignalen und Debris zu unterscheiden. Signale, die auf markierte Zellen zurückzuführen sind, sollten auf der Diagonalen zu finden sein. Störsignale, wie Debris, werden als diffus verteilte Punkte gemessen.

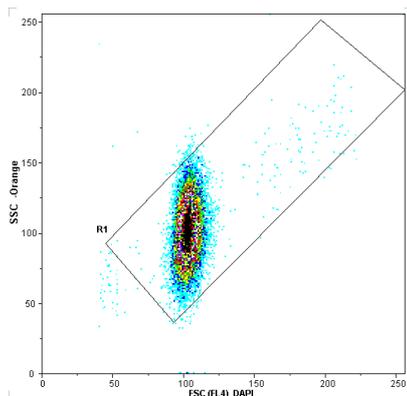


Abb. 5: Zweiparameter-Histogramm einer EDTA-Vollblutprobe

Zwei Fluoreszenzsignale einer Zelle werden hier miteinander kombiniert. Auf der Abszisse werden die 450 nm-Signale verarbeitet und mit denen der Ordinate bei 590 nm kombiniert. Die Zahl der Ereignisse ist durch die Farbintensität der Punkte in diesem Zweiparameter-Histogramm wiedergegeben. Auch hier lässt sich die Zahl der Ereignisse über so genannte Gates (R1) bestimmen.

Jede Zelle mit einer spezifischen Parameterkonstellation erzeugt einen Punkt („dot“) an einer bestimmten Stelle in dem Zweiparameter-Punktehistogramm (Dotplot). Haben Zellen den gleichen Gehalt an gemessenem Zellinhaltsstoff, liegen sie übereinander. Die Quantitätsbeurteilung wird durch Farbabstufungen ermöglicht.

Zellpopulationen mit ähnlichen Eigenschaften erscheinen in Form von Punktwolken („cluster“).

Gating

Für eine genauere Auswertung solcher Cluster und um die interessierenden Zellen von Aggregaten, Zelltrümmern etc. abzugrenzen, können Auswertefenster gesetzt werden – so genannte „Gates“.

Bei einem Einparameter-Histogramm sind dies lineare Gates, die die interessierende Population beinhalten (s. Abb. 4).

In Zweiparameter-Histogrammen werden polygonale Fenster, im vorliegenden Fall z.B. ein rechteckiges Gate gesetzt, um eine Begrenzung zu erzielen (s. Abb. 5).

CyFlow-Durchflusszytometer

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Durchflusszytometer der Firma Partec (Münster, Deutschland) mit der Gerätebezeichnung CyFlow (s. Abb. 6) eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein portables Durchflusszytometer mit zwei optischen Parametern (2x Fluoreszenz, 450 nm und 590 nm) und einer Quecksilberhöchstdruck-Bogenlampe, die UV-Licht der Wellenlänge 350 nm emittiert sowie einem extern angeschlossenen PC (Pentium mit 1000 MHz und 128 MB RAM). Als Software dient die Windows basierte FloMax-Software (Partec, Münster, Deutschland), die die graphische Aufarbeitung der Zellzählung in Echtzeit ermöglicht.

Die Analysen wurden mit einer großen Volumeneinheit von 500 μ l (Standard 200 μ l) durchgeführt.



Abb. 6: CyFlow-Durchflusszytometer

Es handelt sich um ein portables Durchflusszytometer mit zwei optischen Parametern.

Rechts im Bild ist die Quecksilberhöchstdruck-Bogenlampe, in der Mitte die spezielle Probenhalterung zu sehen.

Durchflusszytometrische Messung

Die isolierten Blutproben (ca. 3-4ml) wurden vor der Präparation für ca. 15 Minuten auf einen Schüttler (Heidolph, Kelheim, Deutschland) gelegt und anschließend einzeln angesetzt, am günstigsten während der laufenden vorherigen Messung. Innerhalb von maximal 10 Minuten nach Probenbereitung erfolgte die Messung [22].

Als Farbstoff wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gewählt, welcher in die DNA aller kernhaltigen Zellen intercalliert [75]. Es wurde ein kommerziell erhältlicher Färbepuffer Cystain R (Partec, Münster, Deutschland) benutzt, der DAPI enthält. Da dieser hohe Konzentrationen an Detergenzien enthält, wurde zudem noch 1:5 mit Färbepuffer ohne Detergenz verdünnt [22]. Das charakteristische Anregungsspektrum für dieses Fluorchrom liegt bei 350 nm, dessen Fluoreszenzmaximum bei 480 nm. DAPI kann bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert werden, im beschriebenen Fall bei 455 nm im blauen Bereich (Filter: EM 450) und 523 nm im orangen Bereich (Filter: EM 590). Dies ermöglicht die Aufnahme eines begrenzten Spektrums und dadurch die Wiedergabe der Signale in einem Ein- oder Zweiparameter-Histogramm.

Mit einer automatischen Pipette (aus Pipettenset, Eppendorf, Deutschland) wurden 140 µl Erythrozytenkonzentrat mit 1260 µl DAPI (1:5) in einem Messröhrchen (3,5 ml, 55 × 12 mm, Sarstedt, Art.-Nr. 55.484) gemischt, dies entspricht einer Verdünnung von 1:10. Da das CyFlow-Gerät 500 µl der 1:10 verdünnten Probe misst, entspricht dies einem gemessenen Nettovolumen von 50 µl.

Kurz vor der Messung wurde die Probe für 2-3 Sekunden auf dem Vortex-Gerät (Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA) durchmischt.

Es war darauf zu achten, dass die aufbereiteten Proben möglichst luftblasenfrei in die Probenröhrchen pipettiert wurden, da Luftblasen den Messvorgang beeinflussen können. Für die Messung wurden die Probenröhrchen so in die Probenhalterung gegeben, dass die Messröhrchen fühlbar einrasteten. Die Messung begann daraufhin automatisch mit einem konstanten Fluss von 6 µl pro Sekunde.

Während einer Messung, die ca. zweieinhalb Minuten dauerte, wurden verschiedene Messstadien angezeigt (Prerun-, Stabilize-, Run- und Count-Phase). In der Prerun-Phase wurden die Zellen mit hoher Geschwindigkeit zum Messbereich transportiert. In der Stabilize-Phase wurde die Geschwindigkeit gedrosselt, der Probenstrom stabilisiert und in

der Run-Phase dann die Zellen analysiert. Erst in der Count-Phase wurde das definierte Volumen von 500 μl gemessen.

Mit der Änderung der Signalverstärkung durch Variation der Hochspannung der Photomultiplier ließen sich die Signale, die den Zellen der G1-Phase (Interphase der Mitose) entsprachen, auf den Kanal 100 einstellen. Dubletten, die zu einem geringen Prozentsatz ($< 2\%$) entstanden, befanden sich in Kanal 200. Diese so genannte Gain-Einstellung erfolgte jeweils zu Anfang eines Messtages durch Messen einer Vollblutprobe, die zugleich als Vergleichsmessung zum Sysmex-Hämatologiecounter diente (s. Abschnitt 2.4.1).

Es wurde ein Auswertefenster zwischen Kanal 60 und 250 gewählt, um vor allem die G1-Zellen zu erfassen. Dieses Gate und sonstige Einstellungen wurden als so genannte Settings gespeichert. Sie konnten bei jeder erneuten Messung aufgerufen werden, so dass gewährleistet war, dass immer mit der gleichen Einstellung gemessen wurde.

Das endgültige Ergebnis wurde als Konzentration in „counts/ ml“ angegeben. Die dazugehörigen Histogramme wurden im PC gespeichert. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurden mittels Division durch 10.000 die Ereignisse in „counts/ μl “ berechnet. Der Leukozytengehalt pro Einheit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Counts / ml} \times \text{Nettovolumen [ml]} = \text{Leukozyten / Einheit}$$

2.4 Präzisionskontrolle/ Kontrollmessungen

2.4.1 Sysmex - Hämatologiecounter

Gerät/ Messprinzip

Das Sysmex K-1000 (Kobe, Japan) ist ein automatisches Hämatologie-Analysengerät für die quantitative in vitro-Diagnostik in klinischen Laboratorien.

Das Gerät besteht aus einem hydraulischen, einem pneumatischen und einem elektronischen System.

Das hydraulische System sorgt für das Ansaugen, Verdünnen, Mischen und Hämolysieren.

Das elektronische System analysiert und verarbeitet die Probensignale und steuert das hydraulische System, sowie den Ausdruck über den Drucker. Des Weiteren überwacht es

den Ablauf der Analyse, die Analysen-Daten und führt die Qualitätskontrolle durch, alles mit Hilfe von Mikroprozessoren.

Das pneumatische System produziert Druckluft und das Vakuum zur Steuerung der Ventile, ferner sorgt es für den Durchfluss der Reagenzien und Proben innerhalb des hydraulischen Systems.

Das Sysmex K-1000 zählt Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten nach dem Widerstandsmessprinzip (Impedanzprinzip). Die Probe wird angesaugt, verdünnt, ggfs. hämolysiert, in die Messkammer überführt und ein definierter Teil dieser Verdünnung durch die Messöffnung geführt. Hier fließt ein schwacher Gleichstrom. Blutzellen werden als positive Spannungssignale zwischen zwei Elektroden registriert, die Höhe des Signals ist den Volumina der auslösenden Partikel proportional. Die Impulse werden gezählt, weiterverarbeitet und sind anschließend in Form von acht Hämatologie-Parametern als Ausdruck erhältlich: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular haemoglobin), MCHC (mean corpuscular haemoglobin concentration) und Thrombozyten.

Folgende Reagenzien werden zur Leukozytenbestimmung genutzt:

- Diluent: Sysmex Cellpack, eine isotone Kochsalzlösung; ca. 28 ml pro Zyklus
- Lysemittel für die Erythrozyten: Sysmex Stromatolyser-3WP; ca. 1 ml pro Zyklus
- Detergenz: Sysmex Cellclean, ein stark alkalisches Detergenz zum Entfernen von Verunreinigungen innerhalb des hydraulischen Systems

Zu jeder Messung wird ca. 0,1 ml des Vollblutes angesaugt, 12 µl davon mit den o.a. Reagenzien verdünnt (1:250) und schließlich 0,4 ml der verdünnten Probe gemessen. Dies entspricht einem Nettovolumen von 1,6 µl der Originalblutprobe.

Nach jeder Messung werden alle Schläuche und Kammern gespült. Kontamination und Verschleppung werden dadurch auf ein Minimum reduziert. Trotz des geringen Nettovolumens wird innerhalb bestimmter Grenzen ein hohes Maß an Richtigkeit und Präzision erzielt.

Laut Herstellerangaben wird eine Präzision mit einem Variationskoeffizienten von 3% oder kleiner und eine Richtigkeit von +/- 3 % erreicht (bezogen auf die Leukozytenmessung). Die Angaben zur Linearität im Bereich von einem Leukozytengehalt von $1,0 - 6,6 \times 10^3 / \mu\text{l}$ liegen bei +/- $0,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$. Die untere Nachweisgrenze liegt bei ca. 100-200 Leukozyten/ µl.

Kontrollmessung

In dieser Untersuchung wurde zu Beginn jedes Messtages der Leukozytengehalt einer frischen Vollblutprobe dreifach mit dem Sysmex K-1000 sowie mit dem CyFlow quantifiziert. Diese Messungen dienten der Kalibrierung des Durchflusszytometers und der Validierung der durchflusszytometrischen Messungen.

Hierzu wurden ca. 2 ml einer frischen Vollblutprobe in ein Probenröhrchen gefüllt und diese dreimal im Sysmex-Hämatologiecounter gemessen.

Diese gleiche Probe wurde am Durchflusszytometer gezählt. Dazu wurde das Blut zunächst 1:10 mit detergentenfreiem Färbepuffer verdünnt, d.h. 4,5 ml Puffer wurden zu 0,5 ml Vollblut mittels automatischer Pipette (Eppendorf, Deutschland) gegeben. Nach Durchmischen (2-3 Sekunden vortexen) wurde diese verdünnte Vollblutprobe nach der oben beschriebenen Methode mit DAPI auf die Endverdünnung 1:100 gebracht. Nach weiterem Vortexen von 2-3 Sekunden erfolgte die Messung mit dem CyFlow.

Anschließend konnten die jeweils dreifach per Sysmex und CyFlow bestimmten Leukozytenzahlen direkt miteinander verglichen werden.

Das Sysmex K-1000 ist ein fester Bestandteil in fast jedem medizinischem Labor. Zahlreiche interne und externe Kontrollen (Teilnahme an Ringversuchen) sichern dessen Zuverlässigkeit. Daher wurden die erhaltenen Ergebnisse als Referenzwerte zur Beurteilung der Messung mittels Durchflusszytometer benutzt.

2.4.2 Ballast-Zählkammer

Gerät/ Bauprinzip

Die Ballast-Kammer („S“ Koch Products, Friedrichsdorf, Deutschland) ist eine Zählkammer für die manuelle mikroskopische Erfassung von Zellen oder anderen Partikeln in Blut oder anderen Flüssigkeiten (z.B. Liquor). Es handelt sich um eine modifizierte Rhodium-bedampfte Nageotte-Kammer, die sich vor allem durch ein verbessertes Zählnetz auszeichnet.

Diese Kammer besteht aus optischem Spezialglas in Form einer dicken Grundplatte, deren Größe einem Objektträger entspricht. Darin eingelassen sind vier Längsnuten, parallel zu den kurzen Seiten, die das mittlere Drittel in zwei Seitenstege und einen Mittelsteg unterteilen. Diese Stege sind plan geschliffen und poliert. Der Mittelsteg ist etwas vertieft und enthält

zwei Zählnetze mit jeweils 400 Kästchen (insgesamt 800 Kästchen); diese entsprechen einem Volumen von $2 \times 50 \mu\text{l}$ ($100 \mu\text{l}$). Das Zählnetz ist vertikal numerisch und horizontal alphabetisch gekennzeichnet. Auf die Außenstege wird mit sanftem Druck das befeuchtete Deckglas geschoben. Es wurde richtig aufgebracht, wenn Newtonsche Ringe zu sehen sind (s. Abb. 7).

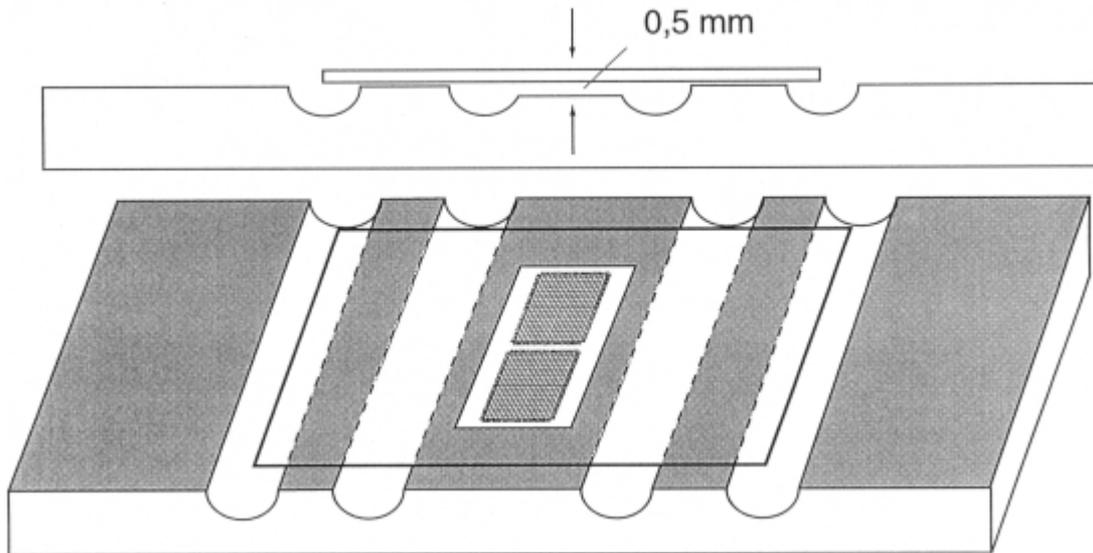


Abb. 7: Ballast-Kammer (modifizierte Nageotte-Kammer).

Diese Zählkammer besitzt zwei Zählnetze mit einem Gesamtvolumen von $100 \mu\text{l}$ der Probe. Die Zählnetze sind vertikal numerisch und horizontal alphabetisch gekennzeichnet.

Kontrollzählung

In der vorliegenden Untersuchungsreihe diente die mikroskopische Leukozytenzählung in der Ballast-Kammer dazu, erhöhte Werte der durchflusszytometrischen Messung (CyFlow) nochmals zu überprüfen. Ein Wert für den Restleukozytengehalt gilt gemäß den genannten Richtlinien als erhöht, wenn er größer als 1×10^6 Leukozyten/ Einheit (entspricht ca. 4 Leukozyten/ μl) ist. „Ausreißer“ in diesem Sinne wurden durch eine doppelt durchgeführte Kammerzählung nochmals kontrolliert.

In Anlehnung an bereits zahlreiche beschriebene Methoden zur Restleukozytenzählung in der Kammer wurde wie folgt verfahren [65]:

$100 \mu\text{l}$ der zu messenden Probe wurden mit $900 \mu\text{l}$ Türkische Lösung (Merck, Deutschland, Ref. 1.09277.0500) verdünnt und durch Vortexen vermischt. Nach 10 Minuten (Lysezeit) wurde beide Zählnetze beschickt und für 15 Minuten zur Sedimentation in eine feuchte

Kammer (Petrischale, Steriplan, Deutschland; mit wasserbefeuchtetem Zellstoff ausgelegt) gegeben.

Anschließend erfolgte die Auszählung mit einem Lichtmikroskop (Leica Mikroskopie u. Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland).

Eine Vormusterung erfolgte mit einer zehnfachen Vergrößerung. Sobald ein Leukozyt zu sehen war, wurden alle 800 Kästchen in zwanzigfacher Vergrößerung ausgezählt. War kein Leukozyt beim ersten Durchmustern identifiziert worden, wurden 20 Kästchen in der 40er-Vergrößerung durchgesehen. Wurde dabei ein Leukozyt entdeckt, wurden ebenfalls alle Kästchen untersucht.

Mit folgender Formel ließ sich schließlich der Leukozytengehalt der jeweiligen Probe ermitteln:

$$\frac{\text{Gezählte Leukozyten} \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)}}{100 \mu\text{l (Kammervolumen)}} = \text{Leukozyten} / \mu\text{l}$$

2.4.3 CD45-Messung

Gerät: PAS

Im Falle von Leukozytenkontaminationen wurden neben den oben aufgeführten Kontrollmessungen mit der Ballast-Zählkammer weitere Vergleichsmessungen notwendig. Als verlässlicher Parameter, dass es sich bei den gemessenen Ereignissen auch wirklich um Leukozyten handelt, gelten Leukozyten-spezifische Oberflächenantigene (CD45). Dieser Nachweis erfolgte mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und mit Hilfe eines auf Lasertechnik basierenden Durchflusszytometers (Particle Analysing System (PAS), Partec, Münster, Deutschland), dessen volumetrisches Messprinzip dem des verwendeten CyFlow gleicht.

Wie das CyFlow arbeitet auch das PAS auf volumetrischer Basis, ist aber mit einem blauen Argon-Ionen-Laser (Anregungswellenlänge von 488 nm) ausgestattet. Mit Hilfe der Laseranregung lassen sich die verschiedensten Fluorochrome wie Phycoerythrin, Fluorescein-Isothiocyanat, Propidiumjodid usw. anregen und deren spezifische Fluoreszenzen detektieren. Mit Hilfe Fluorochrome-konjugierter Antikörper können Zellen anhand ihrer CD-Oberflächenantigene (CD45, CD4, CD8 usw.) klassifiziert werden. Das PAS wird von der gleichen Software unterstützt wie das CyFlow (FloMax, Partec, Münster, Deutschland).

Kontrollmessung

Leukozyten tragen auf ihrer Oberfläche spezifische Marker. Dies sind in der Regel Proteine, die die Eingruppierung in so genannte CD-Cluster (Cluster of Differentiation) ermöglichen. Das CD45-Antigen wird auch als Pan-Leukozytenmarker bezeichnet und ist auf allen Leukozyten nachzuweisen. Es unterscheidet damit Leukozyten von anderen Blutbestandteilen wie Thrombozyten und Erythrozyten [72, 88].

Die mit Hilfe der Kernfärbung als kontaminiert identifizierten Blutprodukte wurden durch die immunologische Kontrollmessung (Bestimmung CD45-positiver Zellen) überprüft.

Im Falle der Kernfärbung können Thrombozytenaggregate oder kernhaltige Erythrozyten auch gemessene Leukozyten vortäuschen.

Protokoll zur Färbung CD45 - positiver Leukozyten:

Zu 100 µl der zu messenden Blutprobe wurden 10 µl monoklonaler Mäuseantikörper (Maus-Anti-Human CD45, Klon 2D1, Becton-Dickinson, USA) mittels automatischer Pipette (Eppendorf, Deutschland) gegeben.

Dieser Antikörper war mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiert, ein Farbstoff, der im grünen Bereich fluoresziert (520 nm). Dieses Gemisch wurde 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Anschließend wurde die Probe in einer zweistündigen Reaktion fixiert und lysiert. Zur Fixierung wurde das Reagenz A der Lyselösung (CyLyse, Partec, Münster, Deutschland) zugegeben, für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und der Ansatz für mindestens weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Zusatz des eigentlichen Lysereagenzes (Reagenz B) inkubiert. War die Lösung dann klar (Lyse der Erythrozyten), konnte die Probe am Durchflusszytometer gemessen werden.

Für die sich anschließende Auswertung wurden mindestens drei unterschiedliche Parameter gemessen. Dies waren die beiden Streulichtparameter (Vorwärts- und Seitwärtstreulicht) sowie ein Fluoreszenzparameter (FITC).

2.5 Statistik

Zur Auswertung dieser Versuchsreihe wurden folgende statistische Methoden angewendet, die kurz erläutert werden sollen.

Wilcoxon-Test

Dieser Test ist ein Zweistichprobentest für verbundene Stichproben. Es handelt sich um einen nichtparametrischen Test, d.h. dieser Test setzt nicht voraus, dass die Messgrößen normalverteilt sind. Dabei werden die Differenzen zwischen den zu vergleichenden Wertepaaren gebildet und diesen werden wiederum nach ihrem absoluten Zahlenwert in wachsender Reihenfolge Rangzahlen R^- und R^+ zugeordnet. Anschließend wird jeweils aus den positiven und negativen Rangzahlen die Summe gebildet. Die Testgröße ist dann die kleinere der beiden Rangsummen $R = \text{Minimum } R^-, R^+$. Die Nullhypothese H_0 kann zum Beispiel lauten: Die Ergebnisse von zwei Messreihen sind vergleichbar. Diese Nullhypothese H_0 wird abgelehnt, falls die Testgröße kleiner/ gleich einem tabellierten Wert ist, der vom vorgegebenen Wert α abhängt [26].

Hypergeometrische Verteilung

Die Hypergeometrische Verteilung ist ein Verteilungsmodell für Zufallsvariablen mit zwei Ausprägungen. Es geht dabei um die Frage, mit welcher Wahrscheinlichkeit $p(X = j)$ die Ausprägung α in einer Stichprobe j -mal vorkommt, wenn diese Stichprobe ohne Zurücklegen bezogen auf ein Urnenmodell ausgewählt wurde.

Die Wahrscheinlichkeitsfunktion lautet wie folgt:

$$p(X = j) = \frac{\binom{s}{j} \times \binom{N-s}{n-j}}{\binom{N}{n}}$$

Sie ist abhängig:

- vom Umfang N der Grundgesamtheit,
- von der Anzahl der Untersuchungseinheiten s , die die gesuchte Ausprägung α aufweisen
- sowie vom Umfang n der Stichprobe.

Ihr Definitionsbereich geht von 0 bis n [51].

Korrelation, Regression

Die Korrelation ermittelt, ob ein Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen besteht. Es wird der Korrelationskoeffizient r berechnet. Voraussetzung ist, dass die entsprechenden Werte x_1 und y_1 , x_2 und y_2 usw. am gleichen Objekt bzw. der gleichen Probe gemessen werden.

Die Gleichung zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten lautet:

$$r_{xy} = \frac{n \times \sum xy - \sum x \times \sum y}{\sqrt{[n \times \sum x^2 - (\sum x)^2] \times [n \times \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

wobei immer $-1 \leq r \leq +1$ gilt.

Je näher der Korrelationskoeffizient r bei $+1$ oder -1 liegt, umso intensiver ist der Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen.

Eine lineare Korrelation kann durch die Regressionsgerade graphisch dargestellt werden. Sie lässt sich durch folgende Formel definieren:

$$y = R \times x + A$$

R und A werden folgendermaßen berechnet [83]:

$$R = \frac{n \times \sum xy - \sum x \times \sum y}{n \times \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$A = \frac{\sum y - R \times \sum x}{n}$$

Die o.a. Berechnungen wurden mit Hilfe der Statistikfunktionen des Excel-Programms (Fa. Microsoft, USA) durchgeführt.

Bland-Altman-Analyse

Die deskriptive Methode nach Bland-Altman ist geeignet, die Übereinstimmung zwischen zwei fehlerbehafteten klinischen Messmethoden zu überprüfen. Dabei handelt es sich um eine Analyse, die als Maß für die Übereinstimmung zweier verschiedener Messmethoden deren Differenz zugrunde legt. Man berechnet zunächst die Differenzen zwischen allen

Messpaaren, anschließend den Mittelwert und die Standardabweichung dieser Differenzen. Die mittlere Differenz ergibt den bias zwischen den beiden Beobachtungen, die Standardabweichung ist ein Maß der Streuung zwischen diesen Beobachtungen. Aufgrund der Annahme, dass beide Messwerte gleich gut oder schlecht sind, wird als der beste Schätzwert der Mittelwert der beiden Beobachtungen gewählt. Trägt man nun die mittlere Differenz gegen den Mittelwert ab, ergeben sich Hinweise, ob es systematische Unterschiede zwischen den beiden Messtechniken in Abhängigkeit von der absoluten Größe der zu messenden Variablen gibt [12, 45].

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

Die Versuchsreihen der Vorversuche dienten dazu, Schlauch- und Beutelinhalt bezüglich des Leukozytenrestgehaltes eines Erythrozytenkonzentrates zu vergleichen. Es sollte untersucht werden, ob die aus einem Schlauchsegment entnommene Probe eines Erythrozytenkonzentrates repräsentativ für den Inhalt des Beutels ist. Es wurden im Verlauf drei verschiedene Methoden (Vorversuche I-III, siehe auch Abschnitt 2.3.2) dazu eingesetzt. Aus den jeweiligen Einzelmessungen von Schlauch- und Beutelinhalt der verschiedenen Erythrozytenkonzentrate wurden die Mittelwerte errechnet und diese paarweise verglichen. Mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS (Version 11.0) wurde durch den Wilcoxon-Test (nichtparametrischer Zweistichproben-test für verbundene Stichproben) die Signifikanz bei einem Niveau von $p = 0,05$ überprüft. Bei einer ermittelten Wahrscheinlichkeit $p > 0,05$ geht man dabei von einer Gleichheit der Paare aus; Werte von $p < 0,05$ bedeuten einen signifikanten Unterschied der Wertepaare.

In den Vorversuchen I und II konnte in allen Fällen durch die Kammerzählung kein Leukozyt gemessen werden, die Ergebnisse betragen jeweils Null. Daraufhin wurde die Kammerzählung bei der Auswertung der Vorversuche außer Acht gelassen.

Vorversuch I

Methode: Es wurden 20 leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate, deren Haltbarkeitsdatum überschritten war, für die Messungen eingesetzt. Die Restleukozyten wurden vierfach mit dem Durchflusszytometer (CyFlow, Partec, Münster) und zweifach mittels Ballast-Kammerzählung gezählt.

Die resultierenden 20 zu vergleichenden Wertepaare aus der durchflusszytometrischen Messung ergaben im Wilcoxon-Test ein $p = 0,00$. Dies bedeutet, dass hier bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ ein signifikanter Unterschied von Beutelinhalt und Schlauchinhalt der verfallenen Erythrozytenkonzentrate vorlag.

Erythrozytenkonzentrat	Mittelwerte Beutelinhalt [Leukozyten/ μ l]	Mittelwerte Schlauchinhalt [Leukozyten/ μ l]
1	0,575	0,425
2	0,150	0,275
3	0,463	0,325
4	0,553	0,300
5	0,388	0,300
6	0,250	0,100
7	0,233	0,075
8	0,113	0,176
9	0,700	0,475
10	0,550	0,200
11	1,200	0,138
12	0,263	0,150
13	0,188	0,063
14	0,250	0,138
15	0,375	0,175
16	0,375	0,238
17	0,500	0,188
18	0,313	0,100
19	0,075	0,075
20	0,225	0,138
Wilcoxon-Test $p = 0,00$		

Tab. 5: Ergebnisse Vorversuch I

Die Proben aus Schlauch und Beutel von 20 leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten, deren Haltbarkeitsdatum überschritten war, wurden jeweils vierfach durchflusszytometrisch auf ihren Restleukozytengehalt hin überprüft. Die Mittelwerte von Schlauch- und Beutelinhalt sind hier gegenüber gestellt. Der Wilcoxon-Test ergab mit $p = 0,00$ einen signifikanten Unterschied.

Vorversuch II

Methode: Es wurden 8 frisch verarbeitete Erythrozytenkonzentrate mit Über- oder Unterschreiten der Spezifikation für das Nettovolumen für die Messungen eingesetzt. Die Restleukozytenbestimmung wurde auch hier vierfach mit dem Durchflusszytometer und zweifach mit der Ballast-Kammer gezählt.

Hier ergaben die zu vergleichenden 8 Wertepaare ein $p = 0,528$ im Wilcoxon-Test. Es kann folglich eine Gleichheit der Werte von Beutel- und Schlauchinhalt der verwendeten frischen Erythrozytenkonzentrate angenommen werden.

Erythrozytenkonzentrat	Mittelwerte Beutelinhalt [Leukozyten/ μ l]	Mittelwerte Schlauchinhalt [Leukozyten/ μ l]
1	0,595	0,830
2	0,160	0,210
3	0,165	0,230
4	0,975	0,970
5	0,155	0,190
6	0,175	0,110
7	0,100	0,135
8	0,295	0,190
Wilcoxon-Test p = 0,528		

Tab. 6: Ergebnisse Vorversuch II

Die Proben aus Schlauch und Beutel von 8 frisch verarbeiteten leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten (mit Über- oder Unterschreiten der Spezifikation für das Nettovolumen) wurden jeweils vierfach durchflusszytometrisch auf ihren Restleukozytengehalt hin überprüft. Die Mittelwerte von Schlauch- und Beutelinhalt sind hier gegenüber gestellt. Der Wilcoxon-Test ergab mit $p = 0,528$ keinen signifikanten Unterschied.

Vorversuch III

Methode: Es wurden 10 frische ungefilterte Erythrozytenkonzentrate für die Messungen eingesetzt. Die Restleukozytenzahl wurde jeweils fünffach mit dem Durchflusszytometer und mit dem automatischen Hämatologie-Zellzählgerät (Sysmex) bestimmt.

Hier wurden Schlauch- und Beutelinhalt jeweils mit zwei unterschiedlichen Zählgeräten ermittelt. Eine ursprünglich zusätzliche Unterscheidung zwischen fünf- und zehnfach ausgestrichenem Schlauchinhalt wurde letztendlich bei der Berechnung des Wilcoxon-Testes nicht berücksichtigt, da diesbezüglich kein Unterschied der Werte bestand.

Bei diesem Vergleich ergab sich für die Messung mit dem Sysmex-Gerät ein $p = 0,074$; für den Vergleich durch die CyFlow-Messung ein $p = 0,155$.

Beide Messreihen zeigten somit keine signifikanten Unterschiede zwischen Schlauch- und Beutelinhalt dieser hier verwendeten Erythrozytenkonzentrate.

Sysmex			Cyflow		
Erythrozytenkonzentrat	Mittelwerte Beutel [Leukozyten/ μl]	Mittelwerte Schlauch [Leukozyten/ μl]	Erythrozytenkonzentrat	Mittelwerte Beutel [Leukozyten/ μl]	Mittelwerte Schlauch [Leukozyten/ μl]
1	2,42	2,46	1	2,36	2,28
2	2,06	2,10	2	1,78	1,80
3	0,28	0,22	3	0,26	0,20
4	7,98	8,10	4	7,22	7,20
5	5,36	5,60	5	4,82	5,30
6	5,80	5,92	6	5,34	5,38
7	3,66	3,74	7	3,84	4,14
8	1,48	1,50	8	1,42	1,58
9	0,98	1,00	9	0,90	0,90
10	6,68	6,82	10	6,10	6,64
Wilcoxon-Test p = 0,074			Wilcoxon-Test p = 0,155		

Tab. 7: Ergebnisse Vorversuch III

Die Proben aus Schlauch und Beutel von 10 frischen ungefilterten Erythrozytenkonzentraten wurden jeweils fünffach durchflusszytometrisch und jeweils fünffach mit dem automatischen Hämatologiecounter Sysmex auf ihren Restleukozytengehalt hin überprüft.

Die Mittelwerte von Schlauch- und Beutelinhalt sind hier jeweils gegenüber gestellt. Der Wilcoxon-Test ergab mit $p = 0,074$ sowie $p = 0,155$ bei beiden Vergleichen keinen signifikanten Unterschied.

3.2 Hauptmessreihe: CyFlow

Insgesamt wurden über einen Zeitraum von 18 Wochen alle produzierten Erythrozytenkonzentrate hinsichtlich ihrer Kontamination durch Leukozyten durchflusszytometrisch untersucht, dies entsprach 1520 Einzelproben. Erythrozytenkonzentrate, deren Leukozytengehalt den durch den Europarat vorgegebenen Richtwert von 1×10^6 Leukozyten/ Einheit überschritten, wurden zusätzlich mikroskopisch in der Kammer ausgezählt sowie einer durchflusszytometrischen Methode unterzogen, die Leukozyten aufgrund ihres spezifischen Oberflächenantigens CD45 identifiziert.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht zu den Ergebnissen:

	Leukozytenzahl/ μl	Leukozytenzahl $\times 10^6$ / Einheit
Minimum	0	0
Maximum	42,40	11,556
Median	0,20	0,053
Mittelwert	0,32	0,090
Standardabweichung	1,15	0,314
Varianz	1,33	0,098
Richtwert	< 4	< 1×10^6
Anzahl Erythrozytenkonzentrate, die Richtwert überschreiten	2	
Prozentualer Anteil Erythrozytenkonzentrate, die Richtwert überschreiten	0,13 %	

Tab. 8: Übersicht der Ergebnisse der Hauptmessreihe ($n = 1520$)

Insgesamt wurden 1520 Erythrozytenkonzentrate auf ihren Restleukozytengehalt hin untersucht. Hier findet sich eine Übersicht über die entsprechende deskriptive Statistik.

Es wird unterschieden zwischen zwei möglichen Einheitsangaben: „Leukozyten/ μl “ und „Leukozyten/ Einheit“.

Die Abweichung der Werte in den Spalten „Leukozytenzahl/ μl “ und „Leukozytenzahl/ Einheit“ voneinander ist auf die unterschiedlichen Beutelgewichte, Bruttogewichte und Nettovolumina, die bei der Berechnung der „Leukozytenzahl/ Einheit“ Eingang finden, zurückzuführen. Dem Richtwert des Restleukozytengehaltes von $< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit wird die „Orientierungsgrenze“ von < 4 Leukozyten/ μl gegenübergestellt.

3.2.1 Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse

Bei der Mehrzahl der 1520 überprüften Erythrozytenkonzentrate (86,12%) wurden bis maximal 0,5 Restleukozyten pro Mikroliter gemessen. Insgesamt wurden lediglich zwei Konzentrate ermittelt, die mit mehr als 4 Zellen pro Mikroliter die deutschen und europäischen Kriterien für Blutprodukte nicht erfüllen.

Die folgende Tabelle 9 und das Diagramm (Abb. 8) stellen eine Übersicht über vier frei gewählte Kategorien dar:

Kategorie [Leukozyten/ μ l]	Anzahl	Anteil [%]
0 - 0,5	1309	86,12
> 0,5 - 1	164	10,79
> 1 - 4	45	2,96
> 4	2	0,13
Gesamt	1520	100

Tab. 9: Verteilung der Ergebnisse des Leukozytengehaltes der Hauptmessreihe ($n = 1520$)

Die Ergebnisse wurden jeweils vier frei gewählten Kategorien des Leukozytengehaltes zugeordnet. Daraus folgt eine Verteilung, die hier in absoluten Zahlen sowie mit dem prozentualen Anteil dargestellt wird.

Verteilung der Ergebnisse

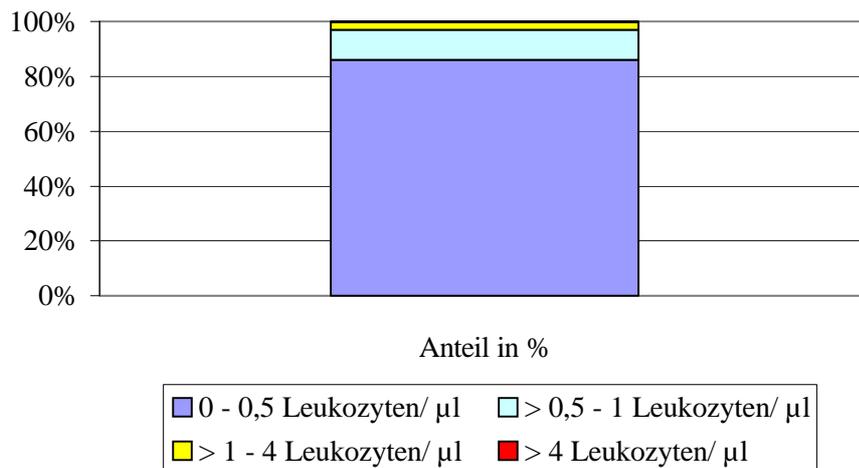


Abb. 8: Prozentuale Verteilung der Ergebnisse/ Hauptmessreihe

Die 1520 Erythrozytenkonzentrate wurden über ihren Gehalt an Restleukozyten in vier Gruppen geteilt. Die obige Graphik zeigt den Anteil der Konzentrate mit einem bestimmten Restgehalt an Leukozyten zur Gesamtmenge.

Den oben wiedergegebenen Ergebnissen liegt eine Einparameter-Messung zugrunde. Für eine bessere Diskriminierung nicht-zellulärer Messereignisse wurde alternativ ein begrenztes Spektrum der DAPI Fluoreszenz bei zwei Wellenlängen (450 nm und 590 nm) aufgenommen und dies für die Auswertung benutzt. Die daraus resultierende Dotplot-Darstellung soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

3.2.2 Dotplotdarstellungen

Nachfolgend werden Beispiele für Ein- und Zweiparameter-Histogramme dargestellt, in denen mit Hilfe von so genannten Gates (Auswertefenster) der Leukozytengehalt analysiert wurde. Aus der Grundgesamtheit von 1520 Erythrozytenkonzentraten werden drei Beispiele für Proben mit unterschiedlichem Leukozytengehalt herausgegriffen. Das dritte Histogramm ist ein Beispiel für ein Erythrozytenkonzentrat mit deutlicher Überschreitung des Richtwertes.

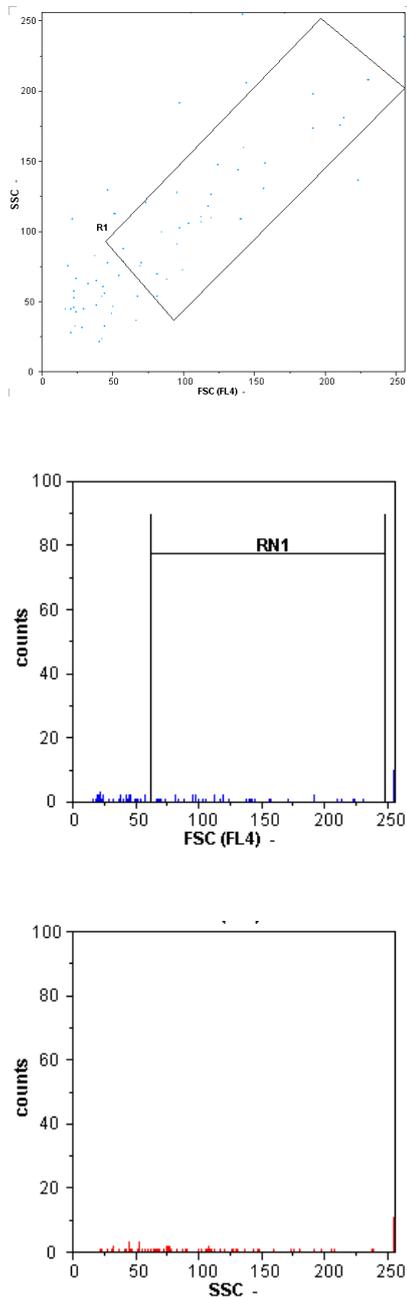


Abb. 9: Beispiel 1 - Messung eines

Erythrozytenkonzentrates mit geringem Leukozytengehalt: 0,58 Leukozyten/ μl (entspricht $0,165 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit).

Die Dotplotdarstellung links zeigt im gewählten polygonalen Gate R1 nur vereinzelt Dots (entsprechend markierten Leukozyten). Dementsprechend gering ist auch der Peak in der Einparameter-Darstellung (jeweils für FSC- und SSC-Fluoreszenz dargestellt, Mitte und rechts). Hier wurde das Auswertefenster RN1 gewählt.

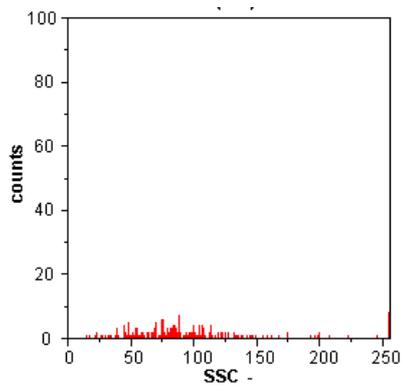
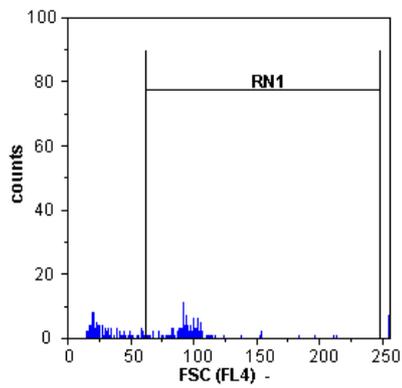
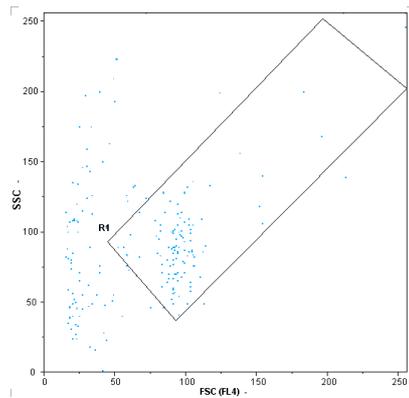


Abb. 10: Beispiel 2 - Messung eines Erythrozytenkonzentrates mit mittlerem Leukozytengehalt: 2,12 Leukozyten/ μl (entspricht $0,536 \times 10^6$ Leukozyten/Einheit). Hier deuten sich ein Cluster in R1 sowie ein Peak in RN1 bei Kanal 100 an. Außerhalb der Gates zeigen diffus verteilte Punkte Störsignale als Debris an.

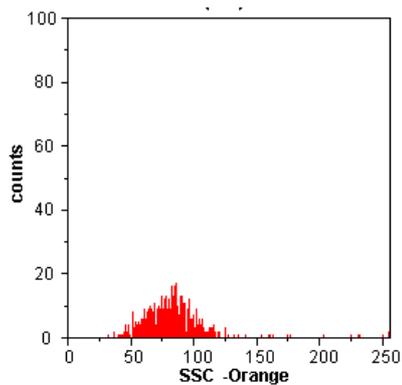
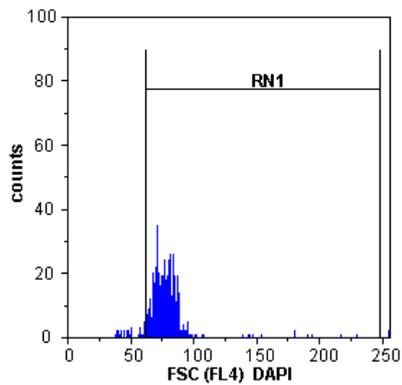
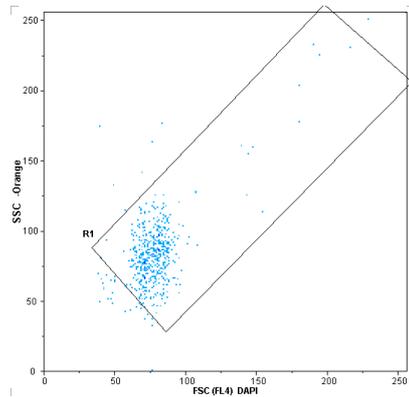


Abb. 11: Beispiel 3 - Messung eines Erythrozytenkonzentrates mit hohem Leukozytengehalt und Überschreitung des Grenzwertes: 10,02 Leukozyten/ μ l (entspricht $2,74 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit). In der Dotplotdarstellung ist in R1 ein Cluster sowie in der Einparameter-Darstellung ein Peak in RN1 abgrenzbar.

Während Beispiel 1 im festgelegten Auswertefenster nur sehr vereinzelt Dots aufweist, sind diese bei Beispiel 2 schon zahlreicher zu sehen. Beispiel 3 zeigt eines der zwei mit Leukozyten kontaminierten Erythrozytenkonzentrate. Hier zeichnet sich ein deutliches, relativ scharf abgegrenztes Leukozytencluster ab.

Zellen außerhalb der Gates stellen Zellen anderer Population dar und, vor allem im Randbereich, Zelldebris.

Im Abschnitt 2.3.3 wurden bereits die Histogramme einer EDTA-Vollblutprobe gezeigt (Abb. 4 und 5). Ein Vergleich dieser mit den Abbildungen 9 bis 11 macht den Unterschied der Größenordnung des Leukozytengehaltes deutlich.

3.2.3 Hypergeometrische Verteilung

Die Hypergeometrische Verteilung ist ein Verteilungsmodell für Zufallsvariablen mit zwei Ausprägungen [51]. Sie wurde bereits in Abschnitt 2.5 beschrieben.

Übertragen auf diese Untersuchungsreihe erhält man folgende Parameter, mit der die Wahrscheinlichkeitsfunktion berechnet werden kann:

$N = 1500$ Erythrozytenkonzentrate

α entspricht einem Leukozytengehalt des Erythrozytenkonzentrates von > 4 Zellen/ μl

$s = 2$ Erythrozytenkonzentrate mit der Ausprägung α

$n = 15$ (entspricht 1% von 1500 Erythrozytenkonzentraten)

Der Einfachheit halber wird bei dieser Berechnung von einer Grundgesamtheit von 1500 Erythrozytenkonzentraten ausgegangen.

Bei der Auswahl des Stichprobenumfanges n wurden die aktuellen Richtlinien der Qualitätskontrolle zugrunde gelegt, die einen Prüfteil von mindestens 1% der hergestellten Einheiten vorschreiben [20].

Hiermit lässt sich nun errechnen, mit welcher angenommenen Wahrscheinlichkeit $p(X = j)$ bei einer Überprüfung von 1 % von 1500 hergestellten leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten beide kontaminierten Erythrozytenkonzentrate ($j = 2$), nur eins ($j = 1$) sowie beide nicht ($j = 0$) entdeckt werden würden.

Die anschließende Übersicht zeigt die Ergebnisse dieser Rechnung:

Aufdeckung von j kontaminierten Erythrozytenkonzentraten	Wahrscheinlichkeit p
$j = 0$	98,0093 %
$j = 1$	1,9813 %
$j = 2$	0,0093 %

Tab. 10: Ergebnisse Hypergeometrische Verteilung

Folgendes Diagramm veranschaulicht die Ergebnisse graphisch:

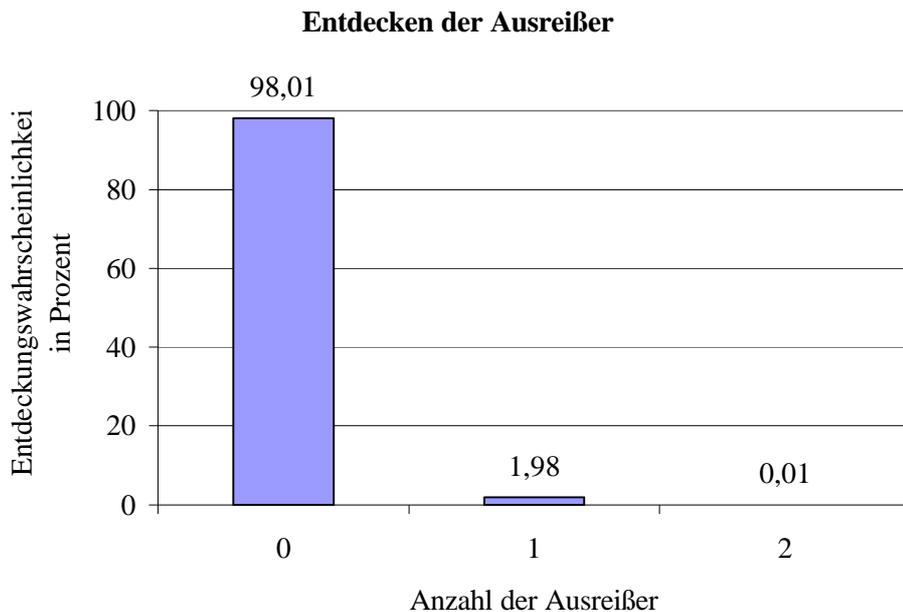


Abb. 12: Ergebnisse Hypergeometrische Verteilung

Bei Überprüfung von 1 % der vorhandenen Erythrozytenkonzentrate bedeutet dies, dass zu 98,01 % keines der beiden kontaminierten Erythrozytenkonzentrate gefunden werden würde. Die Wahrscheinlichkeit, nur einen der beiden Ausreißer zu finden, beträgt 1,98 %, beide zu finden, lediglich 0,01 %.

Wendet man die Rechnung der hypergeometrischen Verteilung auf angenommene Werte von Ausreißeranzahlen von beispielsweise $j = 5, 10$ und 15 an, geht die Entdeckungswahrscheinlichkeit weiter gegen Null oder beträgt praktisch Null.

Ein Ergebnis von genau Null erhält man bei einer Ausreißeranzahl von $j > 15$, da der Prüfanteil von 1% der Gesamtmenge, entsprechend einem Stichprobenumfang von 15 Erythrozytenkonzentraten, diese Anzahl per se nicht decken würde.

3.3 Präzisionskontrolle/ Kontrollmessungen

3.3.1 Sysmex - Hämatologiecounter

Zur Kalibrierung des CyFlow-Durchflusszytometers und zur Validierung der Messungen wurde zu Beginn jedes Messtages der Leukozytengehalt einer frischen Vollblutprobe

dreifach mit dem Hämatologiecounter Sysmex K-1000 sowie mit dem CyFlow-Durchflusszytometer bestimmt.

Jeden Tag konnten so die drei Messergebnisse des CyFlow denen des Sysmex gegenübergestellt und mit ihnen verglichen werden. Hier ein Beispiel für einen der 67 Messtage:

Messtag (16.04.2002)	Cyflow	Sysmex
1.Messung [Leukozyten/ $\mu\text{l} \times 10^3$]	4,6	5,7
2.Messung [Leukozyten/ $\mu\text{l} \times 10^3$]	6,3	5,5
3.Messung [Leukozyten/ $\mu\text{l} \times 10^3$]	5,8	5,5
Mittelwert [Leukozyten/ $\mu\text{l} \times 10^3$]	5,6	5,6

Tab. 11: Vergleichsmessungen CyFlow vs. Sysmex

Der Leukozytengehalt einer frischen Vollblutprobe wurde an jedem Untersuchungstag jeweils dreifach durchflusszytometrisch (CyFlow) sowie mit dem Hämatologiecounter Sysmex bestimmt. Die Mittelwerte wurden jeweils miteinander verglichen.

Durch Berechnen der einzelnen Mittelwerte erhält man 67 Wertepaare.

Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der beiden Techniken bei $p = 0,73$ (Wilcoxon-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$).

Die Analyse nach Pearson ergibt für diese Werte eine Korrelation von $r = 0,902$.

Trägt man die Ergebnisse der beiden Messtechniken gegeneinander auf, ergibt sich folgendes Bild:

Vergleichsmessung CyFlow vs. Sysmex

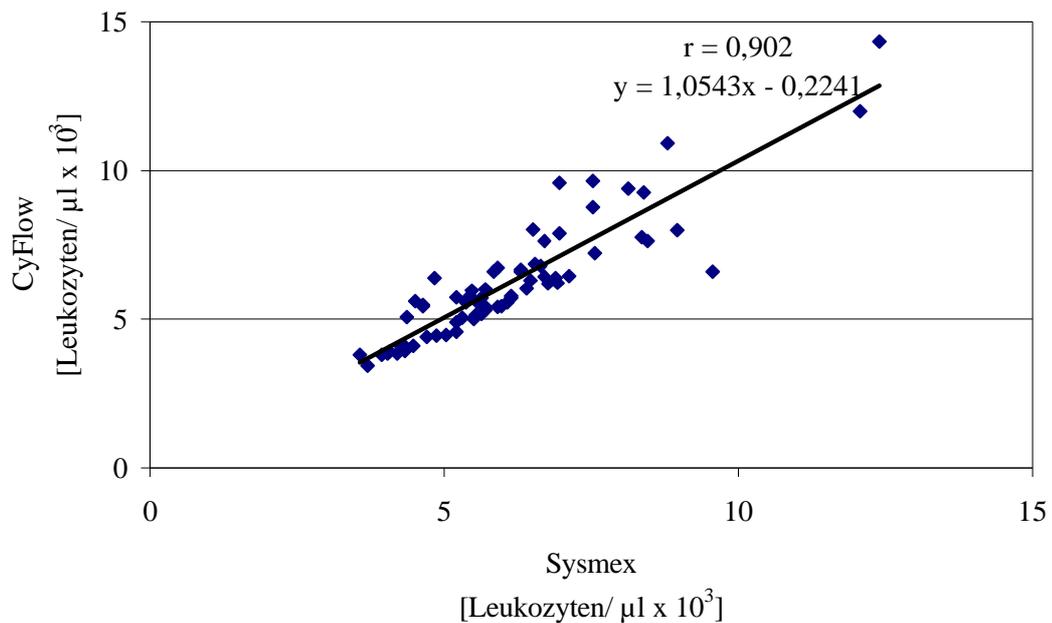


Abb. 13: Vergleichsmessungen CyFlow vs. Sysmex

Hier sind die durchflusszytometrischen Ergebnisse (CyFlow) gegen die Ergebnisse des Hämatologiecounters (Sysmex) aufgetragen. Es ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,902$. Eingezeichnet ist ebenfalls die Regressionsgrade mit entsprechender Gleichung.

Die bereits angesprochene Korrelation der beiden Methoden deutet mit einem Wert von $r = 0,902$ bereits Übereinstimmung an. Ergänzend können die Ergebnisse mit der so genannten deskriptiven Analyse nach Bland-Altman betrachtet werden [12]. Dabei handelt es sich um eine Analyse, die als Maß für die Übereinstimmung zweier verschiedener Messmethoden deren Differenz zugrunde legt. Man berechnet zunächst die Differenzen zwischen allen Messpaaren, anschließend den Mittelwert und die Standardabweichung dieser Differenzen. Die mittlere Differenz ergibt den bias zwischen den beiden Beobachtungen, die Standardabweichung ist ein Maß der Streuung (s. Abb. 14).

Im vorliegenden Beispiel erhält man einen bias von $0,11 \text{ Leukozyten/ } \mu\text{l} \times 10^3$ (fettgedruckte Linie) sowie eine Standardabweichung von $0,88 \text{ Leukozyten/ } \mu\text{l} \times 10^3$ (der Bereich der zweifachen Standardabweichung nach oben und unten ist durch die dünnen Linien begrenzt).

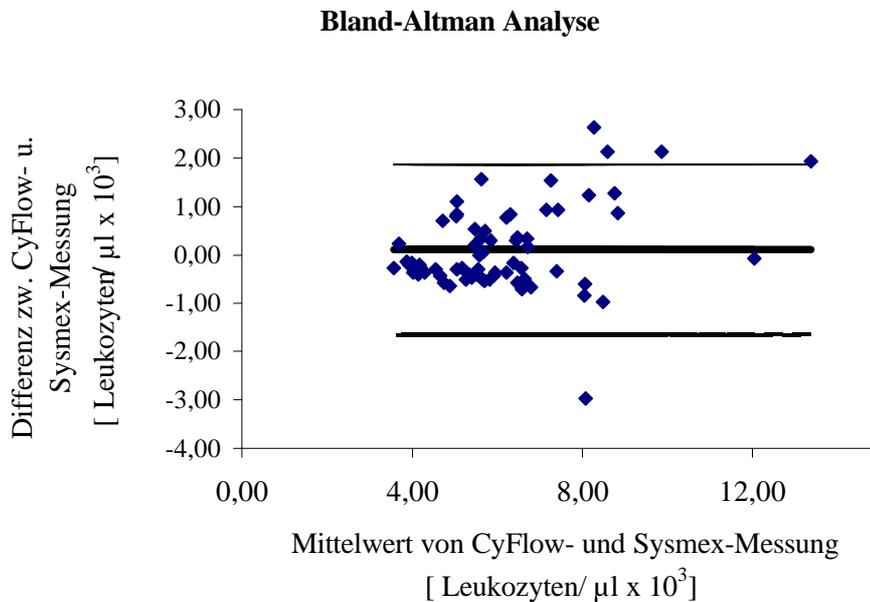


Abb. 14: Bland-Altman Analyse

Hier wurden die Mittelwerte der Wertepaare beider Methoden (CyFlow und Sysmex) auf der Abszisse gegen die Differenz der Methoden auf der Ordinate aufgetragen. Jede Probe wurde dreimal sowohl mit dem CyFlow als auch mit dem Sysmex gemessen, die Differenz wurde aus den jeweiligen Mittelwerten errechnet. Die fett gedruckte Linie zeigt die mittlere Differenz (bias) an. Die Werte streuen bis auf fünf Ausnahmen im Bereich der zweifachen Standardabweichung (dünne Linien) um diese mittlere Differenz. Das bedeutet, dass ca. 92,54 % der Werte (insgesamt 67 Wertepaare) innerhalb dieser Standardabweichung liegen.

Beide Techniken lieferten laut Bland-Altman-Analyse Werte, deren Differenzen gering waren. Sie streuen - bis auf fünf Ausnahmen - im Bereich der zweifachen Standardabweichung um den Mittelwert der Differenzen. Dieser Mittelwert ist wie die Abbildung zeigt, leicht ins Positive verschoben (bias von $0,11 \text{ Leukozyten/ } \mu\text{l} \times 10^3$). Der Hämatologiecounter misst daher leicht niedrigere Werte als die CyFlow-Technik mittels Kernfärbung, was aber, wie bereits oben gezeigt, nicht im signifikanten Bereich liegt.

3.3.2 Ballast-Zählkammer

Die mikroskopische Zellzählung in der Ballast-Kammer diente, wie schon erwähnt, als Kontrollzählung bei erhöhten Werten der durchflusszytometrischen Messung (CyFlow). Für zwei Erythrozytenkonzentrate (s. Tab. 12 und Abb. 15) wurden Werte ermittelt, die den Richtwert von $< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit (entspricht $< 4 \text{ Leukozyten/ } \mu\text{l}$) überschritten. Die Proben dieser Erythrozytenkonzentrate wurden anschließend jeweils zweifach mikroskopisch ausgezählt.

Erythrozytenkonzentrat	CyFlow [Leukozyten/ μl]	Ballast-Kammer (Mittelwert nach doppelter Zählung) [Leukozyten/ μl]
Ausreißer 1	10,02	4,75
Ausreißer 2	42,2	10,85

Tab. 12: Ausreißer-Vergleich CyFlow vs. Ballast-Kammer

Die zwei Erythrozytenkonzentrate, die durchflusszytometrisch (CyFlow) erhöhte Werte lieferten, wurden jeweils zweifach in der Ballast-Kammer ausgezählt. Der resultierende Mittelwert wird hier dem CyFlow-Wert gegenüber gestellt

Vergleicht man anhand der obigen Tabelle die Ergebnisse dieser zwei Messmethoden, so zeigen sich deutliche Unterschiede der Messergebnisse. In der Ballast-Kammer wurden im Vergleich zur durchflusszytometrischen Messung weniger als ein Drittel oder weniger als die Hälfte der Leukozyten gezählt.

Folgende Abbildung veranschaulicht diesen Unterschied graphisch. Es wurden die Ergebnisse gegeneinander aufgetragen. Bei Übereinstimmung der Messergebnisse der beiden Verfahren würden die Datenpunkte im Bereich der eingezeichneten Geraden liegen oder eng um diese streuen. Stattdessen stehen die zwei hier vorliegenden Wertepaare in keiner Beziehung zu dieser Linie.

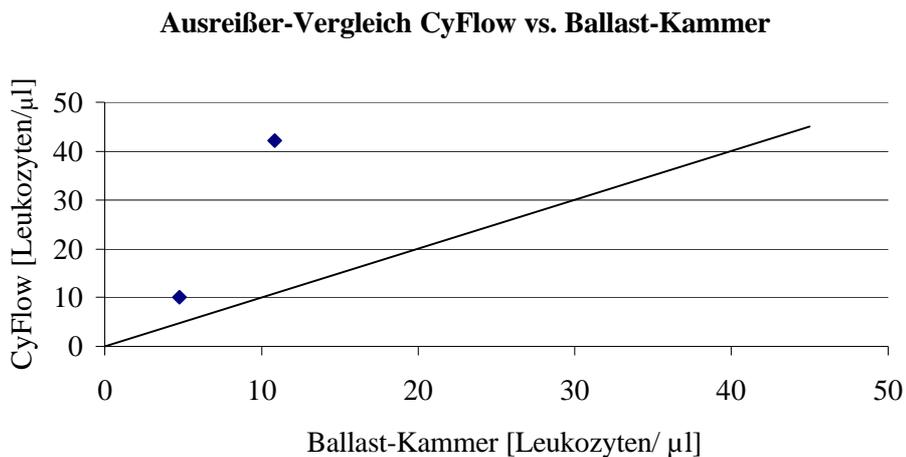


Abb. 15: Ausreißer-Vergleich CyFlow vs. Ballast-Kammer

Die zwei erhöhten Werte der durchflusszytometrischen Untersuchung (CyFlow) werden hier gegen die Ergebnisse der Kammerzählung aufgetragen. Die Werte liegen in keiner Beziehung zu der eingezeichneten Geraden, die den Bereich identischer Ergebnisse beider Untersuchungen anzeigt.

3.3.3 CD 45-Messung

Die zwei in der durchflusszytometrischen Untersuchung als vermeintlich kontaminiert identifizierten Erythrozytenkonzentrate wurden immunologisch mit dem PAS-Durchflusszytometer kontrolliert. Hiermit werden die Leukozyten nicht durch ihre mittels DAPI angefärbte DNA (CyFlow) bestimmt, sondern aufgrund ihrer spezifischen CD 45-Oberflächenantigene, die über monoklonale Antikörper mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen werden können, detektiert und quantifiziert. Durch diese Kontrollmessung sollte ausgeschlossen oder bestätigt werden, dass die DAPI-Signale im CyFlow auch tatsächlich auf Leukozyten zurückzuführen sind.

Die zwei potentiell kontaminierten Proben wurden jeweils zweifach im PAS analysiert und daraus jeweils der Mittelwert gebildet. Es ergibt sich folgende Übersicht der Ergebnisse aus den drei Methoden:

Erythrozyten-konzentrat	CyFlow [Leukozyten/ μ l]	Ballast-Kammer [Leukozyten/ μ l]	PAS CD 45-Messung [Leukozyten/ μ l]
Ausreißer 1	10,02	4,75	10,71
Ausreißer 2	42,2	10,85	34,96

Tab. 13: Ausreißer-Vergleich CyFlow vs. Ballast-Kammer vs. PAS

Nach der CyFlow-Messung und der Kammerzählung wurden die zwei potentiell kontaminierten Proben im PAS-Durchflusszytometer auf ihren Leukozytengehalt hin anhand der CD 45-Bestimmung untersucht. Hier sind die Ergebnisse (Mittelwert bei Mehrfachbestimmung) aller drei Messmethoden nebeneinander aufgetragen.

Jeweils ein Beispielhistogramm der doppelt durchgeführten Messung mit dem PAS-Durchflusszytometer ist für beide auffälligen Proben nachfolgend aufgeführt (Abb. 16 u. 17).

Ein Auswertefenster (Gate Q2) sowie ein Backgate (Gate R2) im FSC/ SCC-Plot erlaubt die Berechnung der enthaltenen Leukozyten. Dabei muss, wie unten in der Berechnung gezeigt, der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

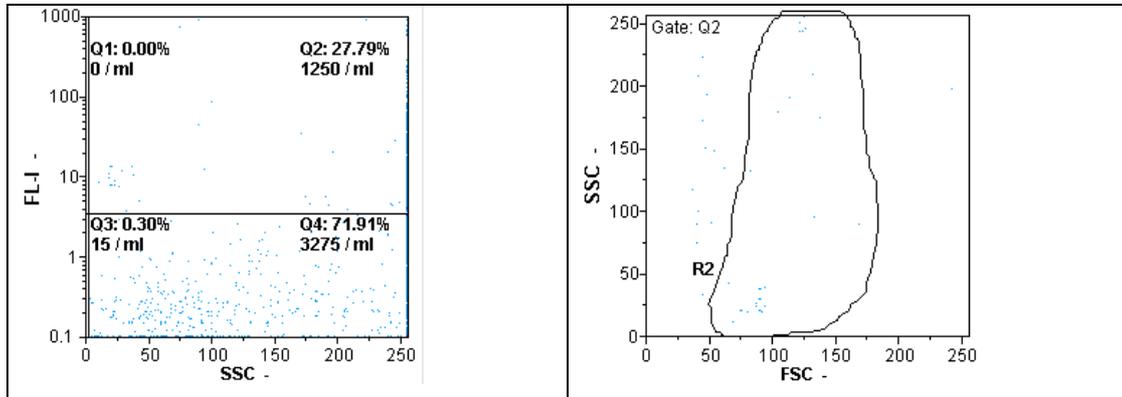


Abb. 16: Ausreißer 1/ PAS

Messung der ersten auffälligen Probe mit der immunologischen Methode des PAS-Durchflusszytometers. Es zeigen sich Ereignisse im Gate Q2 sowie Backgate R2 im FSC/ SSC-Plot. Entscheidend für die Berechnung sind die Ereignisse im Backgate R2 (425 Zellen/ ml).

Berechnung: $425 \text{ Zellen/ ml} \times 27,1 \text{ (Verdünnungsfaktor)} : 1000 = 11,52 \text{ Leukozyten/ } \mu\text{l}$

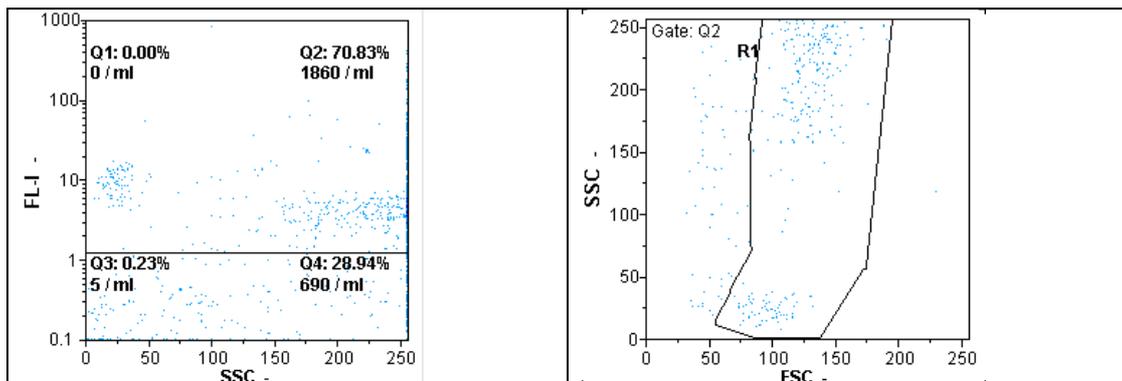


Abb. 17: Ausreißer 2/ PAS

Messung der zweiten auffälligen Probe im PAS-Durchflusszytometer. Hier sind im Vergleich zur Abb. 16 deutlichere Cluster in beiden gesetzten Gates (Q2 und R1) zu sehen. Die gemessene Zellzahl im Backgate R1 liegt bei 1355 Zellen/ ml.

Berechnung: $1355 \text{ Zellen/ ml} \times 27,1 \text{ (Verdünnungsfaktor)} : 1000 = 36,72 \text{ Leukozyten/ } \mu\text{l}$

Auch hier lassen sich die immunologischen Ergebnisse gegen die Ergebnisse nach Kernfärbung auftragen (Abb. 18). Die eingezeichnete Diagonale soll richtungweisend für den Bereich der identischen Ergebnisse beider Methoden sein. Während bei dem ersten Ausreißer beide Methoden gleiche Werte liefern und der entsprechende Punkt folglich auf der eingezeichneten Diagonalen liegt, misst die CD 45-Messung beim zweiten Ausreißer einen leicht niedrigeren Gehalt an Leukozyten als das CyFlow. Der entsprechende Punkt liegt etwas entfernt von der Geraden.

Hier ist eine deutlich größere Übereinstimmung zuerkennen als beim o.a. Vergleich CyFlow versus Ballast-Kammer (Abb. 15).

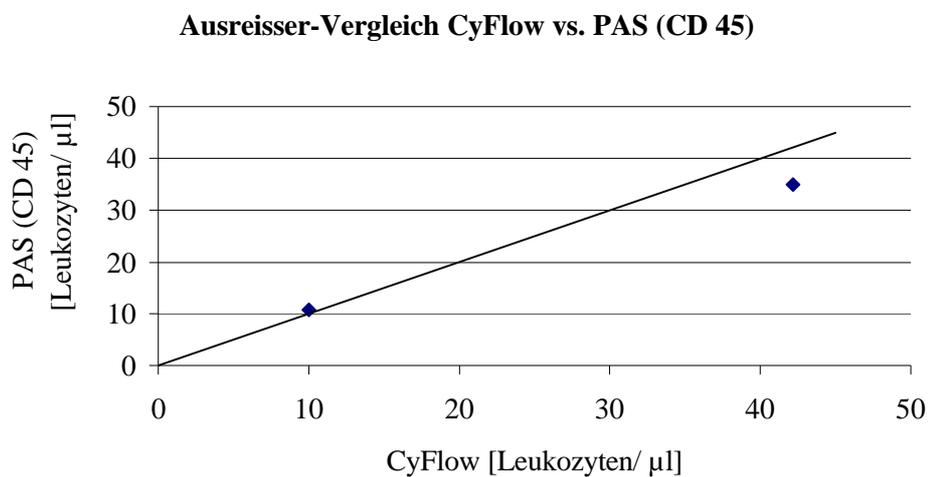


Abb. 18: Ausreißer-Vergleich CyFlow vs. PAS (CD 45)

Die zwei erhöhten Werte der durchflusszytometrischen Untersuchung mittels Kernfärbung (CyFlow) werden hier gegen die immunologischen Ergebnisse des PAS aufgetragen. Die Werte liegen in deutlicher Beziehung zu der eingezeichneten Geraden, die den Bereich identischer Ergebnisse beider Untersuchungen anzeigt.

4 Diskussion

Das in dieser Studie angewandte Verfahren der volumetrischen Messung kernhaltiger Zellen mit dem Durchflusszytometer soll auf seine Eignung zur Restleukozytenzählung in leukozytenreduzierten Erythrozytenkonzentraten untersucht werden.

Im Einleitungsteil wurden bereits die möglichen Folgen einer unentdeckten Leukozytenkontamination von Erythrozytenkonzentraten beschrieben. Daraus ergibt sich die Konsequenz einer möglichst genauen und zuverlässigen Qualitätskontrolle. An die entsprechenden Kontrollgeräte müssen hohe Anforderungen gestellt werden. Bisher galt die mikroskopische Zellzählung in der Nageotte-Kammer als Goldstandard zur Restleukozytenzählung in Blutprodukten. Aufgrund der offensichtlichen, bereits erwähnten Nachteile dieser Methode wird nach Alternativen gesucht. Das hier angewandte Verfahren soll in dieser Arbeit als eine mögliche Alternative diskutiert werden. Aber auch die Qualitätskontrollrichtlinien zur Restleukozytenzählung an sich sollen anhand einer großen Versuchsreihe mit 1500 Erythrozytenkonzentraten in ihren Auswirkungen überprüft werden.

4.1 Auswertung Vorversuche

Die Herstellung und der Umgang mit Erythrozytenkonzentraten werden durch die Pharmabetriebsverordnung geregelt und unterliegen damit strengen Sicherheitsbestimmungen. Die Entnahme von Proben zu Kontrollzwecken wie Test auf Kontamination und Infektion muss über dafür vorgesehene vom Beutel abgehende Schläuche vorgenommen werden. Um eine repräsentatives Aliquot zu isolieren, muss der Inhalt des Beutels gut durchmischt, der Schlauch nach mehrmaligem Ausstreichen gefüllt und ein Segment davon mittels Schweißnaht abgetrennt werden. Eine direkte Probeentnahme aus dem Beutel würde das Erythrozytenkonzentrat unsteril machen, es dürfte nicht weiter verwendet werden.

Diese Methode stellt die einzige Möglichkeit dar, kleine Mengen eines Erythrozytenkonzentrates unter sterilen Bedingungen zu isolieren. Da sie eine wichtige Grundlage dieser Arbeit ist, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, die klären sollten, ob der Inhalt des Schlauches dem des Beutels entspricht. Bislang war die Überprüfung der Probeentnahme zur Qualitätskontrolle noch nicht Inhalt vergleichender Untersuchungen.

Im ersten Vorversuch wurden die Restleukozytenmengen aus Beutel- und Schlauchinhalt von 20 Erythrozytenkonzentraten verglichen, die das vom Hersteller angegebene Verfallsdatum - in diesem Fall nach 42 Tagen Lagerung - überschritten hatten.

Im Wilcoxon-Test ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen. Dies kann verschiedene Gründe haben. Mit Werten zwischen 0,075 und 0,7 pro Mikroliter liegen die Leukozytenzahlen in einem Bereich, der starken statistischen Schwankungen unterliegt. Die untere Nachweisgrenze der durchflusszytometrischen Methode wurde in früheren Experimenten mit 0,83 Leukozyten pro Mikroliter Erythrozytenkonzentrat angegeben [22]. Folglich liegen die hier ermittelten Werte außerhalb des Messbereiches. Allerdings wurde in den beschriebenen Experimenten mit einem Probenvolumen von 200 µl gearbeitet, welches im Rahmen dieser Arbeit auf 500 µl erhöht wurde. Des Weiteren könnte die Überschreitung der Haltbarkeit ein Grund für die signifikanten Unterschiede im Wilcoxon-Test sein. Subtrahiert man die Ergebnisse (siehe Tab. 5) des Schlauchinhaltes von denen des Beutelinhaltes ergeben sich bis auf zwei Ausnahmen positive Differenzen. Dies bedeutet, dass bei 18 von 20 Messungen im Schlauch weniger Leukozyten als im Beutel ermittelt wurden. Hier ist eventuell die Ursache in trotz verbesserten Konservierungs- und Lagerungsbedingungen weiterhin vorkommenden Lagerungsschäden zu finden. Diese mögen vor allem die Erythrozyten selbst, aber sicher auch andere Zellen wie Leukozyten betreffen. Dabei sind Veränderungen der Form, der Fließeigenschaften und die in geringem Maße sicher auch noch nach Einführung der allgemeinen Leukozytendepletion vorkommende Bildung von Mikroaggregaten zu beachten [72]. Die Tatsache, dass fast bei allen Vergleichsmessungen weniger Leukozyten im Schlauch als im Beutel gemessen wurden, lässt vermuten, dass hier die Form des Schlauches, d.h. der geringe Durchmesser von in der Regel 2,9-3,1 mm eine Rolle spielt.

Nach diesen ersten Hinweisen wurden für den zweiten, einem methodisch identisch durchgeführten Vorversuch, 8 frisch verarbeitete Erythrozytenkonzentrate mit Über- oder Unterschreiten der Spezifikation für das Nettovolumen gewählt (siehe Tab. 6). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied des Restleukozytengehaltes von Beutel- und Schlauchinhalt. Dies deutet darauf hin, dass der Restleukozytengehalt des Schlauches mit dem des Beutels vergleichbar ist, sofern es sich um frische Erythrozytenkonzentrate handelt. Dieses Ergebnis kann als Bestätigung für die oben erwähnte These gedeutet werden, dass das Alter des Erythrozytenkonzentrates durchaus Einfluss auf Vergleichsmessungen hat. Die Differenzen von Beutel- und Schlauchinhalt zeigen eine ausgeglichene Verteilung, d.h. hier lässt sich keine Tendenz zu höheren oder tieferen Werten feststellen. Dies deutet auch hier darauf hin, dass das Alter des Präparates eine Ursache für diesen Effekt zu sein scheint und weniger der oben bereits erwähnte enge Durchmesser des Schlauchsystems.

Die Vergleichswerte mit der Ballast-Kammer aus den Vorversuchen I und II erbrachten gegenüber den durchflusszytometrischen Ergebnissen niedrigere Zellzahlen (in der Regel Ergebnisse von Null). Dies könnte mit der Begrenztheit dieser Methode bei niedrigen Zellzahlen zusammenhängen, zumal in der Literatur unterschiedliche untere Nachweisgrenzen für die Kammerzählung angegeben werden. Die niedrigste untere Nachweisgrenze von 0,2 Leukozyten/ μl wurde von Masse publiziert [65]. Diesem Wert stehen höhere Nachweisgrenzen bis zu 2 Zellen/ μl gegenüber [33].

Bei dieser Art der manuellen Zählung ist es ferner möglich, dass individuelle Fehler zu hohen Schwankungen in den Zählergebnissen führen können. Besonders deutlich wird die Variabilität in den Zählergebnissen bei Personen ohne langjährige Erfahrung im Umgang mit der Zählkammer. Das gilt als Bestätigung für den bereits vermehrt in der Literatur geäußerten Vorwurf, die Kammerzählung sei zu subjektiv und weise große Variabilität auf [22, 35, 73].

In einem dritten Vorversuch wurden Erythrozytenkonzentrate mit hohen Leukozytenzahlen eingesetzt, um die Vergleichbarkeit von Beutel- und Schlauchinhalt zu untersuchen. Hierzu wurden 10 ungefilterte, ebenfalls frische Erythrozytenkonzentrate ausgewählt. Eine Kammerzählung wurde hier nicht durchgeführt, stattdessen wurden die Ergebnisse des Durchflusszytometers mit denen des automatischen Hämatologiecounters (Sysmex) verglichen. Beide Messreihen ergaben keine signifikanten Unterschiede im Wilcoxon-Test. Die Ergebnisse stimmen mit denen aus Vorversuch II überein und belegen die Übereinstimmung des Restleukozytengehaltes in Schlauch und Beutel, unabhängig von der Konzentration der Zellen im Produkt. Zusätzlich wurde festgestellt, dass fünf- oder zehnmaliges Ausstreichen des Schlauches zu keinem Unterschied in den Ergebnissen führt. Dennoch fiel die Entscheidung in der Hauptmessreihe zugunsten des zehnmaligen Ausstreichens des Schlauches vor jeder Probeentnahme.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass bei frischen Erythrozytenkonzentraten sowohl im niedrigen Zellzahlbereich als auch bei hohen Zellzahlen der aus einem Schlauchsegment ermittelte Restleukozytengehalt durchaus mit dem des Beutelinhaltes vergleichbar ist. Daher wurde in der Hauptmessreihe der Restleukozytengehalt aus den Schlauchsegmenten gezählt.

4.2 Bedeutung der Restleukozytenzählung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde bereits ausführlich erläutert, welche Beweggründe weltweit in verschiedenen Ländern zur Einführung der universellen Leukozytendepletion von Blutprodukten führten. Ebenfalls wurde bereits genauer auf die einzelnen Komplikationen eingegangen, die aus der Anwesenheit von kontaminierenden Leukozyten resultieren können (Kapitel 1.2.2).

Weil Blutprodukte gemäß § 2 (1) AMG Arzneimittel sind, darf der Einfluss von Leukozyten auf den Transfuserfolg nicht mißachtet werden. Anders widerspräche dies § 28 Abs. 3c Nr. 1 und 2 des Arzneimittelgesetzes, der die Qualität der Blutprodukte und die möglichst umfassende Reduktion von Nebenwirkungen gewährleisten soll [43].

Mehrere Autoren haben in ihren Arbeiten den Versuch gemacht, für das Auftreten einzelner Komplikationen Schwellenwerte des Restleukozytengehaltes anzugeben - diese Angaben sind sehr unterschiedlich [14, 50]. Die heutige Filtergeneration erreicht eine Leukozytendepletion weit unterhalb dieser Angaben bis zu einer Reduktion der Leukozyten von fünf Dekaden [8, 18, 84].

Hinzu kommt der für Deutschland und Europa durch die Qualitätskontrollrichtlinien vorgegebene Grenzwert von $< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit, den ein Erythrozytenkonzentrat nach Herstellung erfüllen muss.

Es wird klar, dass die genaue Quantifizierung von Restleukozyten unabdingbar ist und dementsprechend hochqualifizierte Kontrollmethoden erforderlich sind. Die zu diesem Zweck gebräuchlichen Verfahren wurden bereits im ersten Kapitel beschrieben.

Im Laufe der Zeit wurden Studien durchgeführt, die die Durchflusszytometrie als eine relativ neue automatische Methode zur Restleukozytenzählung in Blutkomponenten darstellen.

Vachula et al. konnten 1993 eine untere durchflusszytometrische Nachweisgrenze von 0,01 Leukozyten/ μ l erreichen; die Dauer einer Messung geben sie mit weniger als 10 Minuten an [97].

Auch Barclay et al. sehen in der Durchflusszytometrie eine wesentlich flexiblere Methode im Vergleich zu bisherigen Standardmethoden. Sie halten eine Sensitivität von etwa 0,15 Leukozyten/ μ l mit dem von ihnen überprüften LeucoCOUNT System (Becton-Dickinson) für möglich. In ihren Untersuchungen dauert eine Messung 2 Minuten [9]. Dieses System eignete sich besonders in einer Multicenterstudie 2004 zur Restleukozytenzählung [28].

In dieser Arbeit wurde das CyFlow (Partec, Münster, Deutschland) zur Restleukozytenzählung verwendet. Dieses auf Volumenmessung basierende Durchflusszytometer wurde vor allem auch im Hinblick auf die Anforderungen der Qualitätskontrolle getestet.

Ein nach gleichem Prinzip messendes Gerät anderen Namens, das CCA (Cell Counter and Analyser, ebenfalls Fa. Partec), wurde bereits 2002 durch Cassens et al. erfolgreich für die absolute Restleukozytenzählung in Erythrozytenkonzentraten anhand von Verdünnungsreihen validiert. Ihre Studie zeigte, dass das CCA den von Dzik beschriebenen Anforderungen wie Linearität, Richtigkeit und Sensitivität gerecht wird. Diese Methode wird von Cassens et al. als akkurate, unkomplizierte und kostengünstige Alternative zum bisherigen Goldstandard der Kammerzählung zur Restleukozytenzählung bezeichnet [22, 33].

Das Cyflow-Durchflusszytometer selbst wurde 2003 in einer Dissertation am Institut für Strahlenbiologie des UKM bereits für die Restleukozytenzählung von Thrombozytenkonzentraten angewandt. Dabei wurde es bezüglich Linearität, Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse u.a. auch anhand von Verdünnungsreihen in doppelt filtrierte Erythrozytenkonzentraten erfolgreich überprüft [15].

4.3 Auswertung Hauptmessreihe und Kontrollmessungen

In mehreren Veröffentlichungen zur Durchflusszytometrie wurde bereits gefordert, dieses Verfahren als neue Alternative noch durch Testung von einer großen Anzahl von Proben endgültig zu bestätigen. Mit größeren Messreihen soll die Versagerrate festgestellt werden, d.h. der Anteil der Produkte, die den Grenzwert von $< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit überschreiten [1, 22, 35].

Dieser Forderung ist diese Arbeit nachgekommen, indem sie die Eignung der hier angewendeten automatischen, auf Volumenmessung basierenden Methode des CyFlow-Durchflusszytometers zur Routinemessung für große Testfrequenzen erfolgreich geprüft hat. Außerdem wurde die Versagerrate bestimmt und in Beziehung zu den bestehenden Richtlinien gesetzt.

1520 frisch verarbeitete leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate wurden prospektiv mit dem CyFlow-Durchflusszytometer auf ihren Restleukozytengehalt hin getestet.

Sysmex-Hämatologiezellzählgerät

Wie in Abschnitt 2.4.1. und 3.3.1. beschrieben dienten tägliche Vergleichsmessungen von Vollblut mit dem automatischen Hämatologiecounter Sysmex K-1000 dazu, das Cyflow-Gerät zu kalibrieren und die Messungen zu validieren. Es wurden Vollblutproben mit entsprechend hohen Zellzahlen gewählt, da das Sysmex nur bis zu einer unteren Grenze von 100 Leukozyten/ μl korrekte Ergebnisse liefert.

An jedem Messtag wurde zu Beginn der Leukozytengehalt einer Vollblutprobe jeweils dreifach mit dem Sysmex und dem CyFlow bestimmt. Die Geräte konnten so direkt verglichen werden. Der Wilcoxon-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,73$) bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$. Die Korrelation nach Pearson mit $r = 0,902$ und die graphische Darstellung (s. Abb. 13) zeigen ebenfalls Übereinstimmung; genauer konnte dies noch durch die deskriptive Analyse nach Bland-Altman bestätigt werden (s. Abb. 14).

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass beide Geräte auf unterschiedlichen Messprinzipien beruhen, wird deutlich, dass die durchflusszytometrischen Ergebnisse korrekt sind. Schwankungen im Bereich einzelner Messungen können durch nicht optimale Durchmischung der Proben sowie auch durch Pipettierfehler verursacht sein. Sie liegen allerdings, wie im Ergebnisteil 3.3.1 gezeigt, nicht im signifikanten Bereich.

CyFlow-Durchflusszytometer

Die Messungen mit Vollblutproben dienten auch der Zuordnung der Leukozyten im Ein- und Zweiparameter-Histogramm des CyFlow (s. Abb. 4 und 5).

Die bei einer Vollblutprobe deutlich entstehenden Peaks und Punktwolken können sicher Zellen der G1-Phase (Interphase der Mitose) mit einfachem Gehalt an DNA zugeordnet und auf den Kanal 100 eingestellt werden. Dubletten (Messung von Zellpärchen) bilden sich entsprechend ihres doppelten DNA-Gehaltes um Kanal 200 ab, dabei handelt es sich aber nur um einen geringen Prozentsatz von $< 2\%$.

Demzufolge werden Gates gesetzt, in diesem Fall zwischen Kanal 65 und 250, um alle interessierenden Zellen zu erfassen. So kann man davon ausgehen, dass Ereignisse im Bereich von Kanal 100 auf jeden Fall Leukozyten entsprechen, da dieser den größten Anteil der Leukozyten der jeweiligen Probe repräsentiert. Dazu ermittelt das Gerät noch die exakte Konzentration an Zellen. Durch Speicherung dieser Settings konnten diese Einstellungen auch bei der Messung leukozytendepletierter Erythrozytenkonzentrate genutzt werden.

Es waren immer wieder einzelne Proben zu finden, die in den Histogrammen Ereignisse unterhalb des Kanals 65 abbildeten. Dabei handelt es sich um Zellbruchstücke (Debris) oder

andere fluoreszierende Partikel, mit denen die Probe z.B. bei der Probenbereitung kontaminiert worden sein kann.

Die oben beschriebene Interpretation der Ergebnisse der Referenzmessungen mit EDTA-Vollblut konnte auf die eigentliche Hauptmessreihe der 1520 Erythrozytenkonzentrate übertragen werden.

Sobald sich also deutliche Punktwolken im Bereich von Kanal 100 abzeichneten und das Gerät zudem eine Konzentration von > 4 Zellen/ μl (entspricht dem Grenzwert von 1×10^6 Leukozyten/ Einheit) anzeigte, konnte die Probe als leukozytenkontaminiert betrachtet werden. Zur Bestätigung wurden solche Ausreißer zusätzlich in der Ballast-Kammer ausgezählt sowie durch eine CD45-Messung kontrolliert.

Einen Gesamtüberblick über die 1520 Messergebnisse gibt Tab. 8. Unter den 1520 leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten fanden sich nur 2 Produkte, die den vom Europarat vorgegebenen Grenzwert überschritten. Dies entspricht einem Anteil von 0,13 % aller untersuchten Produkte. Abb. 8 zeigt wie verschwindend gering dieser Anteil der Ausreißer ist: Der zugeordnete Balken ist in der graphischen Darstellung nicht zu erkennen. Im Mittel wurde bei den 1520 Erythrozytenkonzentraten ein Restleukozytengehalt von 0,32 Zellen/ μl gezählt, was einem Wert von $0,09 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit entspricht und damit weit unter dem Richtwert liegt.

Tab. 9 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Ergebnisse über vier frei gewählte Kategorien. Es fällt auf, dass 86,12% der Ergebnisse innerhalb der Kategorie von 0 – 0,5 Leukozyten/ μl in einem sehr niedrigen Bereich liegen. Der Anteil der Ergebnisse, die > 1 Leukozyt/ μl betragen, fällt mit 2,96 % sehr gering aus und liegt damit auch noch weit unterhalb des Grenzwertes.

Unter 1520 Präparaten lediglich 2 Ausreißer zu finden, spricht zunächst einmal für eine gute und effektive Filterleistung. Das im Institut für Transfusionsmedizin des UKM und auch im Rahmen dieser Studie verwendete inline-Filtersystem Leukotrap WB (Pall Newquay, Cornwall, UK) funktioniert gut und belegt die Ergebnisse früherer speziell auf die Überprüfung von Filterleistungen angelegte Studien [10, 103].

Die durch die CyFlow-Messung als leukozytenkontaminiert aufgedeckten Erythrozytenkonzentrate wurden wie bereits beschrieben weiteren Kontrolluntersuchungen unterzogen - zunächst einer zweifachen Zählung in der Ballast-Kammer.

Kontrolluntersuchung mit der Ballast-Zählkammer

Tab. 12 und Abb. 15 veranschaulichen die Ergebnisse dieser Kontrolluntersuchung im Vergleich zu den Werten des CyFlow. Es zeigt sich ein klarer Unterschied mit erheblich niedrigeren Ergebnissen der Ballast-Kammerauszählung. Die Untersuchung bestätigt, dass diese zwei Proben auf jeden Fall leukozytenkontaminiert waren, weil beide Ergebnisse den Grenzwert von 4 Leukozyten/ μl überschreiten und die ausgezählten Leukozyten sicher als solche zu erkennen waren. Allerdings scheint diese Methode schlecht mit der Durchflusszytometrie zu korrelieren. Eine endgültige Aussage dazu ist erst nach Auswertung der zweiten Kontrolluntersuchung, der CD45-Bestimmung (s.u.), möglich.

Eine mögliche Ursache kann der Vorwurf sein, den Dzik et al. 2000 in ihrer Multicenterstudie äußerten: Sie stellten fest, dass die Zellzählung durch die Nageotte-Kammer im Vergleich zur Durchflusszytometrie und mikrovolumetrischen Fluorimetrie zur Unterschätzung neigt und weniger genau ist [35].

Des Weiteren wird auch hier die Erfahrung und Fähigkeit des Untersuchers eine beeinflussende Rolle spielen. Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits bei den Vorversuchen gemacht. Subjektivität wird der Kammerzählung auch in der Literatur vorgeworfen [22, 35, 73].

Die mikroskopische Zellzählung in der Ballast-Kammer nach Nageotte gilt immer noch als Goldstandard der Restleukozytenzählung, sie ist die verbreitetste Methode [65, 66].

Obwohl sich in einer Studie von Masse et al. 1992 bereits Grenzen der mikroskopischen Zellzählung im niedrigen Zellzahlbereich andeuteten, wurde diese Methode als einfach und ausreichend für die Qualitätskontrolle von Blutprodukten angesehen. Der Durchflusszytometrie warf man vor, technisch zu kompliziert zu sein und ihrerseits keine Referenzmethode zu haben [66].

Die Angaben der Sensitivitätsgrenze für die Kammerzählung sind sehr unterschiedlich.

Masse sieht die Grenze bei 10 gezählten Leukozyten pro Kammer. Bei einem Volumen der Nageotte-Kammer von 100 μl entspricht dies einer Sensitivität von 0,2 Zellen/ μl [65].

Rebulla et al. liegen mit ihrer Angabe höher: In einer Multicenterstudie ermittelten sie eine Sensitivität der Nageotte-Kammer von 1 Zelle/ μl ; sie konnten im Bereich darunter mit der Durchflusszytometrie bis 0,1 Zelle/ μl bessere Ergebnisse erzielen [82].

Dzik nennt eine untere Nachweisgrenze für die Nageotte-Kammer von 2 Zellen/ μl [33].

In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Nageotte-Kammer, die Ballast-Zählkammer verwendet. Sie besteht aus zwei Zählnetzen von jeweils 50 μl Volumen. Insgesamt wurden

100 μl einer 1:10 verdünnten Probe ausgezählt, was einem Nettovolumen der Probe von 2×5 μl entspricht. Folgende Überlegung lässt auf die theoretische absolute Nachweisgrenze schließen: Um wenigstens ein positives Zählergebnis zu erhalten, muss mindestens ein Leukozyt pro 5 μl Probe gezählt werden. Dies entspräche dann einer Konzentration von 0,2 Leukozyten/ μl .

Hieraus wird die Diskrepanz zu der von Dzik beschriebenen Sensitivität deutlich. Er hält lediglich das Zehnfache davon, nämlich 2 Zellen/ μl mikroskopisch auszuzählen, für möglich. Diese Grenze kommt dem durch die Richtlinien vorgegebenem Grenzwert von 1×10^6 Leukozyten/ Einheit, welcher 4 Leukozyten/ μl entspricht, schon sehr nahe. Dadurch entstehen Zweifel in Bezug auf die Eignung der Kammerzählung zur Restleukozytenzählung in wie gezeigt sehr niedrigen Zellzahlbereichen.

Vergleicht man die Methode der Kammerzählung mit der Durchflusszytometrie fallen neben den bereits mehrfach erwähnten Nachteilen der Kammerzählung weitere Nachteile dieser Methode und Vorteile der Durchflusszytometrie auf. Bereits genannt wurden die schlechtere Sensitivität und die Subjektivität der Kammerzählung. Die Durchflusszytometrie ist vom Untersucher unabhängig. Sie kann zudem innerhalb weniger Stunden erlernt werden, während die Kammerzählung einer längeren Lernphase und mehr Erfahrung bedarf.

In der Ballast-Kammer ist es möglich, ein Nettovolumen von 10 μl auszuzählen. Im Gegensatz dazu kann bei dem hier verwendeten CyFlow ein Nettoprobenvolumen von 50 μl untersucht werden. Entsprechende technische Änderungen würden sogar ein Nettovolumen von 100 μl ermöglichen. Das CyFlow kann also allein schon aufgrund der Tatsache, ein fünf- bis zehnfach höheres Volumen auszählen zu können, eine bessere Sensitivität erreichen. Dass dieser Zusammenhang besteht, beschreibt Dumont [30].

Ein weiterer Unterschied liegt in der unterschiedlichen Dauer einer einzelnen Messung. Während eine Probe im CyFlow innerhalb von 2-3 Minuten ausgezählt und in der Zwischenzeit sogar die nächste Probe vorbereitet werden kann, nimmt die Auszählung einer Kammer zwischen 20 und 30 Minuten in Anspruch. In einer Stunde können mit dem CyFlow ungefähr 30 Proben gemessen werden, die Kammerzählung erlaubt es, lediglich ca. 3 Proben zu bearbeiten.

Cassens et al. erörtern in ihrer Arbeit zudem den finanziellen Aspekt. Sicherlich sind zunächst die Anschaffungskosten eines Durchflusszytometers höher als die einer Ballast-Kammer. Es muss aber beachtet werden, dass die laufenden Kosten wiederum relativ gering sind [22].

CD45-Bestimmung mittels PAS-Durchflusszytometer

Die zwei offensichtlich leukozytenkontaminierten Proben wurden zusätzlich mit einer immunchemischen Methode (CD45) untersucht. Durch die Bestimmung des leukozytenspezifischen Antigens CD45 sollte der endgültige Beweis erbracht werden, dass es sich wirklich um Leukozyten handelt. Dieser Nachweis erfolgte, wie in Kapitel 2.4.3 geschildert, durch spezifisch fluoreszenzmarkierte Antikörper mit einem auf Lasertechnik basierenden PAS-Durchflusszytometers (Particle Analysing System, Partec, Münster, Deutschland), dessen Messprinzip dem verwendeten CyFlow gleicht.

Die Ergebnisse (Kapitel 3.3.3) zeigen eine wesentlich bessere Übereinstimmung mit dem Cyflow als der Vergleich CyFlow versus Ballast-Kammer. Vor allem der Wert des ersten Ausreißers wird sehr genau bestätigt. Auch die gegeneinander aufgetragenen Werte veranschaulichen den engen Zusammenhang. Eventuelle Abweichungen wie hier im Falle des zweiten Ausreißers, sind - wie in der Literatur beschrieben - durch Lyseeffekte erklärbar [23, 46].

Insgesamt wird durch diese Kontrollmessung endgültig bewiesen, dass die Ergebnisse des CyFlow korrekt sind: Bei den zwei Ausreißern handelt es sich tatsächlich um leukozytenkontaminierte Erythrozytenkonzentrate. Diese beiden Blutprodukte wurden selbstverständlich nach Erhalt des CyFlow-Ergebnisses gesperrt und aus dem Verkehr gezogen.

Die letzte Kontrolluntersuchung mittels CD45-Bestimmung belegt außerdem die oben bereits angesprochene Feststellung, dass die Ergebnisse der Ballast-Kammer sehr schlecht mit denen des CyFlow korrelieren. Mögliche Ursachen sind bereits genannt worden.

Weiterhin müssen folgende Fehlerquellen, die es bei der Kammerzählung zu berücksichtigen gilt, ursächlich in Betracht gezogen werden [107]. Ein Teil davon gilt entsprechend auch für durchflusszytometrische Verfahren (im Folgenden mit * markiert).

- Blutprobe verwechselt*
- Blutprobe geronnen oder unzureichend gemischt*
- Reagenzien verunreinigt*
- Pipetten-Typ verwechselt*
- Pipetten-Markierung missachtet*
- Verdünnungsfaktor falsch*

- Benutzung von ungeeichten, defekten, spülfeuchten oder ungereinigten Gerätschaften*
- Durchmischung des Pipetten-Inhalts mangelhaft*
- Deckglas falsch auf die Kammer geschoben
- Erste Pipettentropfen nicht verworfen*
- Kammer nicht luftblasenfrei gefüllt
- Kammer überfüllt
- Sedimentationszeit zu kurz
- Trotz ungleichmäßiger Zellverteilung ausgezählt
- Zählung falsch durchgeführt*
- Rechenfehler, Schreibfehler*
- Fehler in der Befundübermittlung*

Qualitätskontrollrichtlinien

Das Ergebnis dieser prospektiven Untersuchung, in der über mehrere Monate alle hergestellten Erythrozytenkonzentrate auf ihren Restleukozytengehalt hin getestet wurden, soll nun vor dem Hintergrund der Qualitätskontrollrichtlinien betrachtet werden.

Zur Erinnerung: Die aktuellen Richtlinien der Bundesärztekammer und auch des Europarates schreiben vor, dass 1% der hergestellten Einheiten und mindestens 4 Erythrozytenkonzentrate pro Monat überprüft werden sollen. 90% der überprüften Einheiten davon wiederum müssen den Grenzwert von $< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit einhalten [20, 47].

In dieser Arbeit wurden bei der Überprüfung von 1520 hergestellten Einheiten lediglich 2 Erythrozytenkonzentrate gefunden, die den Grenzwert nicht einhielten. Dies entspricht einem Anteil von 0,13 %. Ein Ergebnis, welches deutlich unter denen ähnlicher Studien liegt, in denen ebenfalls eine große Anzahl von Erythrozytenkonzentraten überprüft wurde. In einer Studie von Kao et al. konnten 0,3–8 % den Standard von hier allerdings $< 5 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit nicht einhalten [57]. Yomtovian et al. ermittelten bei 1869 getesteten leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten eine Versagerrate von 8,3 % bezüglich des europäischen Grenzwertes [105].

Nicht zuletzt durch diese Arbeit wird deutlich, dass die Versagerrate zwar äußerst klein, aber vorhanden ist. Somit kann ein Eindruck gewonnen werden, in welcher Größenordnung diese Versagerrate tatsächlich liegt. Dies ist wiederum wichtig für eine dementsprechend angepasste Qualitätskontrolle.

Qualitätskontrolle besteht, wie Dumont et al. in ihrem Artikel erläutern, aus mehreren Säulen [31]. Diese Arbeit will lediglich den Aspekt der Restleukozytenzählung durchleuchten. Eine wichtige Frage ist, ob die Testung von 1 % der hergestellten Produkte ausreichend dafür ist, vermeintliche Kontaminationen zu erfassen und weitere Folgen zu vermeiden. Durch Übertragung der hier ermittelten Zahlen auf das Modell der Hypergeometrischen Verteilung und basierend auf den aktuellen Richtlinien, sollte diese Frage eine Antwort finden (Kapitel 3.2.3).

Mit Hilfe der Hypergeometrischen Verteilung konnte berechnet werden, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, bei zwei gegebenen Versagern in einer Menge von insgesamt 1500 Erythrozytenkonzentraten, diese in einer Stichprobe von 1 % der Einheiten zu entdecken. Die Ergebnisse zeigt Tab. 10. Mit 98,0093 % Wahrscheinlichkeit findet man keinen der beiden Ausreißer, mit nur 1,9813 % einen davon. Die Wahrscheinlichkeit beide Versager aufzudecken liegt mit $p = 0,0093$ % nahe Null. Angenommen, es lägen höhere Zahlen von Ausreißern vor, wird es immer unwahrscheinlicher alle Ausreißer zu finden, diese Wahrscheinlichkeit beträgt dann praktisch Null. Interessant ist sicher auch die Überlegung, dass es per se bei Versagerraten von > 15 unmöglich ist, alle diese aufzufinden, weil 1 % zu prüfen nur 15 Erythrozytenkonzentrate als Stichprobe entspräche.

Aus dem Geschilderten geht hervor, dass mit sehr großer Wahrscheinlichkeit durch die übliche Testung von 1 % der hergestellten Erythrozytenkonzentrate die beiden Ausreißer übersehen worden wären. Dass dies auch bei anders gegebenen Zahlen der Fall gewesen wäre, wurde ebenfalls deutlich gemacht. Welches Risiko damit für den Empfänger dieser kontaminierten Blutprodukte verbunden gewesen wäre, wurde im ersten Teil dieser Arbeit erläutert.

Das Ziel, bei der Transfusion von Blutprodukten das Risiko von Nebenwirkungen so weit wie möglich zu reduzieren, ist nach Meinung der Autorin dieser Arbeit mit einer Kontrolle gemäß den aktuellen Richtlinien nicht möglich. Unter der Vorstellung, dass in Deutschland die gesamte Herstellung von Erythrozytenkonzentraten auf gefilterte Produkte umgestellt werden musste, besteht eine Diskrepanz zwischen der mit hohen Kosten verbundenen generellen Umstellung und dem mäßigen Interesse, die Produkte in ihrer Qualität ausreichend zu überprüfen. Eine deutlich erhöhte Prüffrequenz ist erforderlich. Idealerweise wäre eine Testung von 100 % der hergestellten Blutprodukte anzustreben. Die

durchgeführte Untersuchung dient als passendes Beispiel: Nur durch Überprüfung aller Präparate waren in diesem Fall die kontaminierten Proben aufzudecken.

Diese Arbeit bestätigt die Untersuchungen von Adams et al., die durch Computer-Simulation schon Hinweise erhielten, dass höhere Testfrequenzen notwendig sind [1]. Sie bietet gleichzeitig auch einen Lösungsansatz für die Umsetzung einer Routinetestung aller hergestellten Blutprodukte. Dumont et al. hielten dies in ihrer 1997 vorgestellten Arbeit mit den bisherigen automatischen Methoden für nicht praktikabel und nicht immer wünschenswert [31].

Die hier vorgestellte durchflusszytometrische Methode mittels volumetrischem Durchflusszytometer hat sich, wie die Ergebnisse zeigen, bei der Messung von 1520 Erythrozytenkonzentraten bewährt. Eine routinemäßige Testung aller hergestellten Erythrozytenkonzentrate ist praktikabel, da es sich um ein zuverlässiges, sehr sensitives und unkompliziert durchzuführendes Verfahren handelt. Die Vorzüge dieser Methode sind ausführlich beschrieben worden.

Selbst wenn durch eine hundertprozentige Testung nur ein Versager gefunden würde, dadurch aber eventuell eine Transfusionskomplikation mit Todesfolge verhindert werden könnte, sollte sich der Aufwand gelohnt haben.

4.4 Schlussfolgerungen

Abschließend können die Ergebnisse dieser Arbeit und deren Diskussion wie folgt zusammengefasst werden:

1. Die Vorversuche bestätigen, was vielfach einfach vorausgesetzt wurde: Eine Probeentnahme aus dem Schlauchsegment eines Erythrozytenkonzentrates ist repräsentativ für den Probeninhalt des Beutels. Wichtige Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit ist - neben ordnungsgemäßem Ausstreichen und Schütteln des Beutels zur Durchmischung - das Alter des Erythrozytenkonzentrates. Nur Proben frischer Erythrozytenkonzentrate bestanden den Vergleich zwischen Schlauch- und Beutelinhalt. Bei Erythrozytenkonzentraten, die das Verfallsdatum des Herstellers überschritten hatten, ergaben sich signifikante Unterschiede. Somit ist die bisher praktizierte Probeentnahme bei frischen Erythrozytenkonzentraten weiterhin vertretbar. Um die genaue Ursache herauszufinden, ab wann das Alter des Erythrozytenkonzentrates von Bedeutung ist, wären weitere Untersuchungen erforderlich.
2. Das hier angewandte CyFlow-Durchflusszytometer konnte sich in der großen Hauptmessreihe behaupten. Es konnte seine Eignung für hohe Testfrequenzen von Erythrozytenkonzentraten unter Beweis stellen. Mit der Überprüfung von 1520 hergestellten Erythrozytenkonzentraten aus dem Institut für Transfusionsmedizin des UKM wurde eine hundertprozentige Testung über mehrere Monate vollzogen. Das CyFlow konnte durch einfache Handhabung, schnelle Messungen und gute Sensitivität den Anforderungen gerecht werden. Die Versagerrate bestehend aus Erythrozytenkonzentraten, die den Richtwert von $< 1 \times 10^6$ Leukozyten/ Einheit überschreiten, machte mit 2 von 1520 Präparaten einen sehr geringen Anteil von 0,13 % aus. Diese zwei Ausreißer wurden durch das CyFlow richtig als solche erkannt. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 100 % für diese hier eingesetzte durchflusszytometrische Methode. Die Präparate, die in der CyFlow-Messung unauffällig waren, können im Umkehrschluss sicher als nicht kontaminiert betrachtet werden. Im Gegensatz zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen waren die Ergebnisse durch die Kammerzählung nicht zufrieden stellend. Hier wurden bereits in der Literatur genannte Nachteile bestätigt. Die hier angewandte Methode der Durchflusszytometrie kann berechtigt als Alternative zur mikroskopischen

Zellzählung und als neuer Goldstandard zur Restleukozytenzählung vorgeschlagen werden.

3. Schließlich sollten auch die aktuellen Qualitätskontrollrichtlinien hinterfragt werden. Die Ergebnisse und statistischen Überlegungen dazu haben deutlich gemacht, dass die beiden Versager dieser Untersuchung durch eine Testfrequenz von 1 % - wie die deutschen und europäischen Richtlinien es vorschreiben - mit einer Wahrscheinlichkeit von praktisch Null aufgedeckt worden wären. Ein Toleranzbereich von zusätzlich noch 10 % ist unverständlich. Diese Richtlinien scheinen der Realität nicht angepasst. Eine deutlich erhöhte Testfrequenz ist erforderlich. Optimal wäre eine Überprüfung aller hergestellten Produkte. Die Ergebnisse zeigen, dass nur unter dieser Bedingung für 1518 Erythrozytenkonzentrate das Risiko für Transfusionskomplikationen minimiert war. Mit der hier vorgestellten Methode ist eine Routinetestung von 100 % der hergestellten Erythrozytenkonzentrate praktikabel.

5 Literaturverzeichnis

- 1 Adams MR, Fisher DM, Dumont LJ, Dzik WH, Heaton WA
Detecting failed WBC-reduction processes: computer simulations of intermittent and continuous process failure. *Transfusion* 2000, 40:1427-1433
- 2 Allen JB, Allen FB
The minimum acceptable level of haemoglobin. *International Anesthesiology Clinics* 1982, 20:1-22
- 3 American College of Physicians
Practice strategies for elective red blood cell transfusion. *Annals of Internal Medicine* 1992, 116:403-406
- 4 American Society of Anesthesiologists, Task Force on Blood Component Therapy
Practical guidelines for blood component therapy. *Anesthesiology* 1996, 84:732-47
- 5 Andea A, Garritsen HSP, Cassens U, Kelsch R, Sibrowski W
A flow-cytometric method for assessing leukocyte contamination in white-cell-depleted blood products. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 1999, 26:53-56
- 6 Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit und Soziale Sicherung
Humanes Cytomegalievirus. *Bundesgesundheitsblatt* 43, 2, 2000, 653-659
- 7 Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit und Soziale Sicherung
Erhöhung der Sicherheit von zellulären Blutkomponenten und quarantänegelagertem Frischplasma durch Untersuchung der Blut- und Plasmaspenden auf Antikörper gegen das Hepatitis-B-Core-Antigen (Anti-HBc). *Bundesgesundheitsblatt im Druck*; <http://www.rki.de>
- 8 AuBuchon JP, Elfath MD, Popovsky MA, et al.
Evaluation of a new prestorage leukoreduction filter for red blood cell units. *Vox Sanguinis* 1997; 72:101-6
- 9 Barclay R, Walker B, Allan R, Reid C, Duffin E, Kane E, Turner M
Flow cytometric determination of residual leucocytes in filter-depleted blood products: An evaluation of Becton-Dickinson`s LeucoCOUNT system. *Transfusion Science* 1998, 19:399-403
- 10 Berril K, Cortus MA
Evaluation of the Pall Medsep Leukotrap WB Whole Blood Filter System -Technical Report, 1997 GSD3279/3M/DAP/0697
- 11 Betriebsverordnung für pharmazeutische Unternehmer (PharmBetrV) in der Fassung vom 8. März 1985 (BGBl.I S. 546)

- 12 Bland JM, Altman DG
Statistical methods for assessing agreement between two measures of clinical measurement. *Lancet* 1986, 1 (8476):307-310
- 13 Blumber N, Heal JM, Gettings KF
WBC reduction of RBC transfusions is associated with a decreased incidence of RBC alloimmunization. *Transfusion* 2003, 43:945-952
- 14 Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA
Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood* 1994, 84:1703-1721
- 15 Bortolussi S
Durchflusszytometrische Untersuchung zum Leukozytengehalt von leukozytenreduzierten Thrombozytenkonzentraten. 2003, Dissertation aus dem Institut für Strahlenbiologie des Universitätsklinikums Münster
- 16 Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, Weisdorf D, Cays M, Schoch G, Banaji M, Haake R, Welk K, Fisher L, McCullough J, Miller W
A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood* 1995, 9:3598-3603
- 17 British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force
Guidelines on the clinical use of leucocyte-depleted blood components. *Transfusion Medicine* 1998, 8:59-71
- 18 Bruil A, Beugeling T, Feijen J, van Aken GW
The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfusion Medicine Reviews* 1995, 9:145-166
- 19 Bundesärztekammer
Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten, 3. Aufl. 2003
<http://www.bundesaerztekammer.de/30/Richtlinien/Leitidx/Blutkomponentenpdf.pdf>
- 20 Bundesärztekammer
Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie), Dezember 2003
<http://www.bundesaerztekammer.de/30/Richtlinien/Richtidx>
- 21 Carson JL, Terrin JL, Barton FB, Aaron R, Greenburg AG, Heck DA, Magaziner J, Merlino FE, Bunce G, McClelland B, Duff A, Noveck H
A pilot randomized trial comparing symptomatic vs. hemoglobin-level-driven red blood cell transfusions following hip fracture. *Transfusion* 1998, 38:522-529
- 22 Cassens U, Greve B, Tapernon K, Nave B, Severin E, Sibrowski W, Göhde W
A novel true volumetric method for the determination of residual leucocytes in blood components. *Vox Sanguinis* 2002, 82:198-206

- 23 Cassens, Gutensohn, Garritsen, Kelsch, Kuehnl, Sibrowski
The influence of different erythrocyte lysing procedures on flow cytometric determination of CD34+ cells in umbilical cord blood transplants. *Transfusion Medicine* 1998, 8:111ff
- 24 Chabanel A, Andreu G, Carrat F, Hervé P
Quality control of leucoreduced cellular blood components in France. *Vox Sanguinis* 2002, 82:67-71
- 25 Debeir J, Noel L, Aullen JP, Frette C, Sari F, Phuong Vo Mai M, Cosson A
The French Haemovigilance System. *Vox Sanguinis* 1999, 77:77-81
- 26 Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Abteilung Klinische Epidemiologie
<http://www.dkfz-heidelberg.de/epi/StatMeth/bioskrip/ivwilcoxon.html>
- 27 Dietz LJ, Dubrow RS, Manian BS, Sizto NL
Volumetric capillary cytometry: A new method for absolute cell enumeration. *Cytometry* 1996, 23:177-186
- 28 Dijkstra-Tiekstra MJ, van der Meer PF
Multicenter evaluation of two flow cytometric methods for counting low levels of white blood cells. *Transfusion* 2004, 44(9):1319-1324
- 29 Dodd RY
Transmission of Parasites and Bacteria by Blood Components. *Vox Sanguinis* 2000, 78 (suppl 2):239-242
- 30 Dumont LJ
Sampling errors and the precision associated with counting very low numbers of white cells in blood components. *Transfusion* 1991, 31(5):428-432
- 31 Dumont LJ, Dzik WH, Rebullia P, Brandwein H, and the members of the Best Working Party of the ISBT
Practical guidelines for process validation and process control of white cell-reduced blood components: report of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion (ISBT). *Transfusion* 1996; 36:11-20
- 32 Dzik S
Leukoreduction: State of the art. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 1998, 25:282-287
- 33 Dzik S
Principles of counting low numbers of leukocytes in leukoreduced blood components. *Transfusion Medicine Reviews* 1997, 11:44-55
- 34 Dzik S, Aubuchon J, Jeffries L, Kleinman St, Manno C, Murphy MF, Popovsky MA, Sayers M, Silberstein LE, Slichter SJ, Vamvakas EC
Leukocyte reduction of blood components: Public policy and new technology. *Transfusion Medicine Reviews* 2000, 14:34-52

- 35 Dzik S, Moroff G, Dumont L
A multicenter study evaluating three methods for counting residual WBCs in WBC-reduced blood components: Nageotte hemocytometry, flow cytometry, and microfluorometry. *Transfusion* 2000, 40:513-520
- 36 Engelfriet CP
Universal leucocyte-depletion of blood components: cell concentrates and plasma. *Vox Sanguinis* 2001, 81:56-77
- 37 Europäische Gemeinschaft - Good laboratory practices.
http://europa.eu.int/documents/parliament/index_de.htm
- 38 Europäische Gemeinschaft - Good manufacturing practices.
http://europa.eu.int/documents/parliament/index_de.htm
- 39 European Commission, Scientific Committee on Medicinal Products and Medicinal Devices on 16 February 2000
Opinion on update of the opinion on the risk quantification for CJD transmission via substances of human origin. Doc.SANCO/SCMPMD/2000/0006.Final
- 40 Fisher M, Chapman JR, Ting A, Morris PJ
Alloimmunisation to HLA antigens following transfusion with leucocyte-poor and purified platelet suspensions. *Vox Sanguinis* 1985, 49:331-335
- 41 Food and Drug Administration (FDA), USA
Guidance for Industry – Pre-Storage Leukocyte Reduction of Whole Blood and Blood Components Intended For Transfusion.
<http://www.fda.gov/cber/gdlns/preleuk.htm>
- 42 Food and Drug Administration (FDA), USA
Recommendations and Licensure Requirements for Leukocyte-Reduced Blood Products, May 29, 1996. <http://www.fda.gov/cber/bldmem/mem52996.txt>
- 43 Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz-AMG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 11. Dezember 1998 (BGBl. I S. 3586)
- 44 Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens (Transfusionsgesetz-TFG) vom 1. Juli 1998, BGBl. I, S. 1752
- 45 Glantz SA
Biostatistik, 4. Auflage McGraw-Hill 1998, S. 250-255
- 46 Greve B, Beller C, Cassens U, Sibrowski W, Severin E, Göhde W
High-grade loss of leukocytes and hematopoietic progenitor cells caused by erythrocyte-lysing procedures for flow cytometric analyses. *Journal of hematology and stem cell research* 2003, 12:321-330
- 47 Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, Council of Europe Publishing, Strasbourg, 2002

- 48 Hébert C, Wells G, Blajchman MA, Marshall J, Martin C, Pagliarello G, Tweedale M, Schweitzer I, Yetisier E
A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. *New England Journal of Medicine* 1999, 340:409-17
- 49 Heddle NM
Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Current Opinion in Hematology* 1999, 6:420 ff
- 50 Heddle NM, Klama LN, Griffith L, Roberts R, Shukla G, Kelton JG
A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. *Transfusion* 1993, 33:794-797
- 51 Heinecke, Hutsch, Regges
Medizinische Biometrie; S. 102 ff
- 52 Hillyer CD, Emmens RK, Zago-Novaretti M, Berkman EM
Methods for the reduction of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection: filtration versus the use of seronegative donor units. *Transfusion* 1994, 34:929-932
- 53 Högman CF, Meryman HAT
Storage Parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. *Transfusion Medicine Reviews* 1999, 13:275-296
- 54 Hughes AS
Leucocyte depleted blood. *Biodmedicine & Pharmacotherapy* 1984, 38:85-88
- 55 James J, Matthews RN, Holdsworth RF, Fulton A, Tauro GP, Hussein S, McGrath KM
The role of filtration in the provision of leukocyte poor red cells to multitransfused patients. *Pathology* 1986, 18:127-130
- 56 Jensen LS, Kissmeyer-Nielsen P, Wolff B, Qvist N
Randomized comparison of leucocyte-depleted versus buffy-coat-poor blood transfusion and complications after colorectal surgery. *Lancet* 1996, 348:841-45
- 57 Kao KJ, Mickel M, Braine HG, et al.
White cell reduction in platelet concentrates and packed red cells by filtration: a multicenter clinical trial. The TRAP Study Group. *Transfusion* 1995, 35:13-9
- 58 Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM
(1997) *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart New York, 9. Aufl.
- 59 Kretschmer V, Weippert-Kretschmer M, Karger R
Notfall- und Massivtransfusion. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 1997, 24:106-113
- 60 Landaw EM, Kanter M, Lawrence DP
Safety of filtered leukocyte-reduced blood products for prevention of transfusion-associated cytomegalovirus infection. *Blood*, 1996; 87:4910-4911

- 61 Lee TH, Stromberg RR, Heitman J, Tran K, Busch MP
Quantitation of residual white cells in filtered blood components by polymerase chain reaction amplification. *Transfusion* 1994, 34:986-994
- 62 Linden JV, Tourault MA, Scribner CL
Decrease in frequency of transfusion fatalities. *Transfusion* 1997, 37:243-244
- 63 Ljungman P
Risk of cytomegalovirus transmission by blood products to immunocompromised patients and means for reduction. *British Journal of Haematology* 2004, 125:107-116
- 64 Löwer J, Paul-Ehrlich-Institut
Übertragung von vCJD durch Blut und andere Gewebe. <http://www.pei.de>
- 65 Masse M
Measurement of low numbers of leucocytes: How should it be done?
In: Högman, Claes (Hrsg.), *Leucocyte Depletion of Blood Components*, Amsterdam, VU University Press 1994
- 66 Masse M, Naegelen C, Pellegrini N, Segier JM, Marpoux N, Beaujean F
Validation of a simple method to count very low white cell concentrations in filtered red cells or platelets. *Transfusion* 1992, 32:565-571
- 67 Mayr WR, Köhler M
Current status of solvent/detergent-treated frozen plasma, whole-blood inline filtration and Creutzfeldt-Jakob disease. *Transfusion* 1999, 39:107
- 68 Mazon, MC
Leukocyte depletion and infection by cytomegalovirus. *Transfusion Clinique et Biologique* 2000, 7 Suppl. 1:31-35
- 69 Medizinproduktegesetz; <http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/mpg/>
- 70 Mollison PL, Engelfriet CA, Contreras M
Blood Transfusion In Clinical Medicine. Blackwell, Oxford 1993
- 71 Moroff G, Luban NL
The irradiation of blood and blood components to prevent graft-versus-host disease: technical issues and guidelines. *Transfusion Medicine Reviews* 1997, 11:15-26
- 72 Müller-Eckhardt C, Kiefel V
Transfusionsmedizin. 2004, 3. Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- 73 Neumüller J, Schwartz DWM, Mayr WR
Demonstration by flow cytometry of the numbers of residual white blood cells and platelets in filtered red blood cell concentrates and plasma preparations. *Vox Sanguinis* 1997, 73:220-229

- 74 Novotny VM, van Dorn R, Witvliet MD, Claas FH, Brand A
Occurrence of allogeneic HLA and non-HLA antibodies after transfusion of
prestorage filtered platelets and red blood cells: a prospective study. *Blood* 1995,
85:1736-1741
- 75 Otto FJ
High resolution analysis of nuclear DNA employing the fluorochrome DAPI.
Methods In Cell Biology, 1994, 41:211-217
- 76 Pamphilon DH, Rider JR, Barbara JAJ, Williamson LM
Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Transfusion
Medicine* 1999, 9:115-123
- 77 Paul-Ehrlich-Institut
Bekanntmachung über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Einführung der
Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten zur Transfusion vom 18.08.2000.
http://www.pei.de/downloads/leuko_final.pdf
- 78 Paul-Ehrlich-Institut
Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln –
Leukozytendepletion von Blutkomponenten zur Transfusion – Abwehr von
Arzneimittelrisiken Stufe 2 vom 12.05.2000. *Bundesanzeiger* Nr. 114 vom
20.06.2000
- 79 Paul-Ehrlich-Institut
Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von
Erythrozytenkonzentraten, Thrombozytenkonzentraten und gefrorenem Frischplasma
- Abwehr von Arzneimittelrisiken Stufe 1. *Bundesanzeiger* Nr. 26 vom 9.02.1999
- 80 Paul-Ehrlich-Institut
Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln –
Verminderung des Risikos von HIV-1-Infektionen durch zelluläre Blutprodukte und
gefrorenes Frischplasma. *Bundesanzeiger* Nr. 103 vom 05.06.2003, S. 12269
- 81 Paul-Ehrlich-Institut
Bekanntmachung über die Zulassung von Arzneimitteln, Abwehr von
Arzneimittelrisiken, Maßnahme zur Risikovorsorge über die Zulassung und
Registrierung von zellulären Blutprodukten und gefrorenem Frischplasma, Stufe II
Bundesanzeiger Nr. 85 vom 07.05.2005, S. 7128
- 82 Rebullá P, Dzik WH
Multicenter evaluation of methods for counting residual white cells in leukocyte-
depleted red blood cells. *Vox Sanguinis* 1994, 66:25-32
- 83 Renner E
(1970) *Mathematisch-statistische Methoden in der praktischen Anwendung*. Verlag
Paul Parey, Berlin Hamburg, S. 66 ff
- 84 Riggert J, Schwartz DWM, Wieding JU, Mayr WR, Köhler M
Prestorage inline filtration of whole blood for obtaining white cell-reduced blood
components. *Transfusion* 1997, 37:1039-1044

- 85 Riggert J, Wolfram I, Fischer I, Humpe A, Simson G, Köhler M
Whole blood filtration without buffy-coat preparation during subsequent separation into red cell concentrate and fresh frozen plasma. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 1997, 24:288 ff
- 86 Robert-Koch-Institut
Stellungnahme des Arbeitskreises Blut vom 16.09.1998 „Filtration von zellulären Blutprodukten“. <http://www.rki.de/GESUND/AKBLUT/STELL02.HTM>
- 87 Rouger Ph, Noizat-Pirenne F, Le Pennec PY
Haemovigilance and transfusion safety in France. *Vox Sanguinis* 2000, 78 (suppl 2):287-289
- 88 Schmitz G, Rothe G
Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Verlag Schattauer 1994, Stuttgart New York; S. 71
- 89 Seghatchian J, Krailadsiri P, Scott CS
Counting of residual WBCs in WBC-reduced blood components: a multicenter evaluation of a microvolume fluorimeter by the United Kingdom National Blood Service. *Transfusion* 2001, 41:93-101
- 90 Seifried E, Roth WK
Annotation – Optimal blood donation screening. *British Journal of Haematology* 2000, 109:694-698
- 91 Sibrowski W
Infektionen durch Bluttransfusion. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 1994, 21 (suppl 1):4-5
- 92 Sirchia G, Rebullà P
Evidence-based medicine: the case for white cell reduction. *Transfusion* 1997, 37:543-549
- 93 Spahn DR, Pasch T
Erythrozytensubstitution: Was ist bekannt über den kritischen Hämatokrit?
Infusionstherapie Transfusionsmedizin 1996, 23:100-105
- 94 Spöhr F, Böttiger BW
Fremdblut sparende Maßnahmen. *Anaesthesist* 2002, 51:221-236
- 95 Stehling L, Simon TL
The red blood cell transfusion trigger. *Archives of pathology and laboratory medicine* 1994, 118:429-434
- 96 Trobisch H, Kruse F, Greiß O, Gnichwitz P, Wagner Th, Kaehn K
Whole blood filtration: processing and storage parameters. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 1997, 24: 359 ff

- 97 Vachula M, Simpson SJ, Martinson JA, Aono FM, Hutchcraft AM, Balma DL, Van Epps DE
A flow cytometric method for counting very low levels of white cells in blood and blood components. *Transfusion* 1993, 33:262-267
- 98 Vamvakas EC, Blajchman MA
Universal WBC reduction: the case for and against. *Transfusion* 2001, 41:691-712
- 99 Van de Watering LMG, Hermans J, Houbiers JGA, van den Broek PJ, Bouter H, Boer F, Harvey MS, Huymans HA, Brand A
Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery – A randomized clinical trial. *Circulation* 1998, 97:562-568
- 100 Van der Linden, P
Transfusion strategy. *European Journal of Anaesthesiology* 2001, 18:495-498
- 101 Wagner SJ
Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sanguinis* 2004, 86:157-163
- 102 Welch HG, Meehan KR, Goodnough LT
Prudent strategies for elective red blood cell transfusion. *Annals of Internal Medicine* 1992, 116:393-402
- 103 Wierckx L, van Dongen W, Sybesma J, Wilkins K, Latter M, Heron A
Plasma prepared using the Pall Medsep Leukotrap Whole Blood filter set. *Vox Sanguinis* 1998, 74 (S1)
- 104 Wittmann G
Bluttransfusion in Zeiten von BSE und CJD. *Bayerisches Ärzteblatt* 2003, 6:343-346
- 105 Yomtovian R, Gernsheimer T, Assmann SF, Mohandas K, Lee TH, Kalish LA, Busch MP, for the Viral Activation Transfusion Study Group
WBC reduction in RBC concentrates by prestorage filtration: multicenter experience. *Transfusion* 2001, 41:1030-1036
- 106 Zander R
Optimaler Hämatokrit 30%: Abschied von einer Illusion. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 1999, 26:186-190
- 107 Zeile G, Baahe M, Henrici G
Kompendium der praktischen Hämatologie. 1980, GIT- Verlag, Darmstadt

6 Lebenslauf

Persönliche Daten Anne Siebert

geb. am 10. Juli 1977
in Lennestadt

Schulbildung

1984-1988 Mariengrundschule Meschede
1988-1997 Gymnasium der Stadt Meschede, Abitur

Studium

10/ 1997-9/ 1998 Medizin, Martin-Luther-Universität Halle/ Saale
10/ 1998-9/ 2000 Medizin, Universität zu Köln
10/ 2000-5/ 2004 Medizin, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

29.08.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.04.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.05.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf

24.05.2004 Teilapprobation
01.10.2004 Vollapprobation

Seit 01.08.2004 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II des Klinikum Krefeld

7 Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Sibrowski für die Überlassung des Themas und dafür, dass ich in den Laboren der Blutbank des Institutes für Transfusionsmedizin arbeiten konnte.

Ich danke auch herzlich Herrn Prof. Göhde, dass ich die Labore und Geräte des Institutes für Strahlenbiologie nutzen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Karin Tapernon, die mir als meine direkte Betreuerin immer mit Rat und Tat beiseite stand.

Besonders möchte ich auch Herrn Dr. Burkhard Greve danken, der für Fragen ständig ein offenes Ohr hatte und vor allem für die konstruktive Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Fischer aus dem Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik, der mir bei statistischen Fragestellungen eine große Hilfe war.

Im Institut für Transfusionsmedizin haben mich die Mitarbeiter der Blutbank unermüdlich und geduldig unterstützt. Ich möchte hier die Medizinisch-Technischen Assistenten Kathrin Schwarte und Markus Jörg nennen, die mich in die Laborarbeit eingeführt haben und mir stets mit guten Tipps weiterhelfen konnten. Dafür danke ich ihnen sehr herzlich.

Ebenso geduldig und hilfsbereit wurde ich durch die Mitarbeiter des Instituts für Strahlenbiologie betreut. Hier möchte ich vor allem der Medizinisch-Technischen Assistentin Gerlind Bellmann und der Landwirtschaftlich-Technischen Assistentin Petra Berkes herzlich danken, die stets wertvolle Ratschläge für mich hatten. Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Severin für die sehr gute Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke Christian sehr herzlich, der es verstanden hat, mich immer wieder zu ermutigen und mir vor allem bei PC-Problemen eine treue Hilfe war.

Schließlich möchte ich meinen Eltern von ganzem Herzen danken, die mich stets unterstützt und gefördert haben.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Prinzip der Pre-Process-Filtration (aus: Informationsmaterial (Nr. BMG T5 143-01/0298) der Fa. Pall Medical GmbH Biomedizin, Dreieich, Deutschland)
- Abbildung 2 Verwendetes Vierfachbeutelssystem mit integriertem Filter (aus: Informationsmaterial (Nr. PMED/1M/DBD/12000) der Fa. Pall Medical GmbH Biomedizin, Dreieich, Deutschland)
- Abbildung 3 Volumetrisches Messprinzip (aus: Informationsmaterial der Fa. Partec, Münster, Deutschland; <http://www.partec.de>)
- Abbildung 4 Einparameter-Histogramm einer EDTA-Vollblutprobe
- Abbildung 5 Zweiparameter-Histogramm einer EDTA-Vollblutprobe
- Abbildung 6 CyFlow-Durchflusszytometer, Foto A. Siebert
- Abbildung 7 Ballast-Kammer (modifizierte Nageotte-Kammer), (aus: Ballast L, Information zur Zellzählung mit der Ballast-Kammer. Fa. „S“Koch Products GmbH & CoKG, Friedrichsdorf, Deutschland)
- Abbildung 8 Prozentuale Verteilung der Ergebnisse/ Hauptmessreihe
- Abbildung 9 Beispiel 1 – niedriger Leukozytengehalt : 0,24 Leukozyten/ μ l
- Abbildung 10 Beispiel 2 – mittlerer Leukozytengehalt : 2,1 Leukozyten/ μ l
- Abbildung 11 Beispiel 3 – hoher Leukozytengehalt, Grenzwert überschritten: 42,4 Leukozyten/ μ l
- Abbildung 12 Ergebnisse Hypergeometrische Verteilung
- Abbildung 13 Vergleichsmessungen CyFlow vs. Sysmex
- Abbildung 14 Bland-Altman-Analyse
- Abbildung 15 Ausreißer-Vergleich CyFlow vs. Ballast-Kammer
- Abbildung 16 Ausreißer 1/ PAS
- Abbildung 17 Ausreißer 2/ PAS
- Abbildung 18 Ausreißer-Vergleich CyFlow vs. PAS (CD 45)

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Häufigkeit von unerwünschten Wirkungen bei der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten
Tabelle 2	Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden zur Restleukozytenzählung
Tabelle 3	Von der Bundesärztekammer geforderte klinische Parameter eines Erythrozytenkonzentrates
Tabelle 4	Vergleich verschiedener Richtlinien zur Qualitätskontrolle
Tabelle 5	Ergebnisse Vorversuch I
Tabelle 6	Ergebnisse Vorversuch II
Tabelle 7	Ergebnisse Vorversuch III
Tabelle 8	Übersicht Ergebnisse Hauptmessreihe
Tabelle 9	Verteilung der Ergebnisse des Leukozytengehaltes der Hauptmessreihe
Tabelle 10	Ergebnisse Hypergeometrische Verteilung
Tabelle 11	Vergleichsmessungen CyFlow vs. Sysmex
Tabelle 12	Ausreißer-Vergleich CyFlow vs. Ballast-Kammer
Tabelle 13	Kontrollmessungen Ausreißer

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	MHC	major histocompatibility complex
AMG	Arzneimittelgesetz		
ATG	Antithymocyte globulin	NAT	Nukleinsäure-Amplifikationstechnik
bzw.	beziehungsweise		
ca.	Circa	nvCJD	Neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit
CMV	Cytomegalievirus		
d.h.	das heißt	o.a.	oben angeführt
EBV	Epstein-Barr-Virus	PAS	Particle Analysing System
FDA	Food and Drug Administration	PEI	Paul-Ehrlich Institut
FNHTR	Febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion	s.	siehe
ggfs.	gegebenenfalls	s.o.	siehe oben
GLP	Good laboratory practices	s.u.	siehe unten
GMP	Good manufacturing practices	Tab.	Tabelle
Hb	Hämoglobin	taGvHD	Transfusionsassoziierte Graft versus Host-Krankheit
HBV	Hepatitis B-Virus	TRALI	Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz
HCV	Hepatitis C-Virus		
HIV	human immunodeficiency virus	u.	und
HLA	human leukocyte antigen	u.a.	unter anderem
HTLV	human T-cell leukemia virus	UKM	Universitätsklinikum Münster
I/ II	I/ II	v.a.	vor allem
MCH	mean corpuscular haemoglobin	vs.	versus
MCHC	mean corpuscular haemoglobin concentration	z.B.	zum Beispiel
MCV	mean corpuscular volume	zw.	zwischen