

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Strahlenbiologie
- Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Göhde -

**Durchflußzytometrische Untersuchung zum Leukozytengehalt von
leukozytenreduzierten Thrombozytenkonzentraten**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Sonia Bortolussi
aus Münster
2004

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

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

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

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Sibrowski

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Strahlenbiologie
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Göhde
Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Göhde
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Sibrowski

ZUSAMMENFASSUNG

Bortolussi, Sonia

Durchflußzytometrische Untersuchung zum Leukozytengehalt von leukozytenreduzierten Thrombozytenkonzentraten

Der Restleukozytengehalt von Thrombozytenkonzentraten gilt als Ursache für zahlreiche Komplikationen im Rahmen der Transfusionsmedizin. Der COUNCIL OF EUROPE schreibt eine maximale Leukozytenkontamination von 1×10^6 pro Bluteinheit bei einer Mindestprüffrequenz von 1% aller Blutproben vor, wobei 90% aller Proben diesem Kriterium entsprechen müssen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 991 leukozytendepletierte Thrombozyten-konzentrate mit Hilfe der durchflußzytometrischen Messung kernhaltiger Zellen mit dem CyFlow-Gerät® auf ihren Restleukozytengehalt hin untersucht. In Gegensatz zu der konventionellen Prüfmethode der Ballastzählkammer bietet die Durchflußzytometrie eine automatisierte und beschleunigte Messung mit höherer Sensitivität.

Insgesamt wurden 59 verdächtige Proben festgestellt. Von diesen überschritten 7 Produkte die erlaubte Leukozytenzahl. 52 der Proben erwiesen sich als qualitativ so fragwürdig, dass sie verworfen werden mussten. Durch mikroskopische Beurteilung mittels Ballastzählkammer und durch immunologischen Nachweis von Leukozyten mittels Färbung mit CD45-Antikörper konnten 7 leukozyten- und 52 debriskontaminierte Konzentrate gefunden werden. Somit wurde bestätigt, dass die Richtlinien zwar eingehalten werden, die Wahrscheinlichkeit, alle kontaminierten Proben bei einer Mindestprüfung von 1% zu detektieren, jedoch gegen Null geht. Um das individuelle Risiko jedes Patienten so weit wie möglich zu reduzieren, ist eine deutlich erhöhte Prüffrequenz dringend erforderlich.

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	<u>Thrombozytentransfusion</u>	2
1.1.1	<u>Einsatzgebiet der Thrombozytentransfusion</u>	2
1.1.2	<u>Indikation der Thrombozytentransfusion</u>	3
1.2	<u>Komplikationen bei der Thrombozytentransfusion</u>	4
1.2.1	<u>Allgemeine Komplikationen bei Bluttransfusionen oder Übertragung von Blutbestandteilen</u>	4
1.2.1.1	<u>Immunologische Transfusionsrisiken</u>	4
1.2.1.2	<u>Nicht-immunologische Transfusionsrisiken</u>	5
1.2.1.3	<u>Durch Blut übertragbare Infektionskrankheiten</u>	6
1.2.2	<u>Komplikationen durch Leukozytenkontamination</u>	8
1.2.2.1	<u>Sensibilisierung / Alloimmunisierung im HLA-System</u>	8
1.2.2.2	<u>Febrile, nicht hämolytische Transfusionsreaktion (FNHTR)</u>	10
1.2.2.3	<u>Graft-versus-Host-Disease (GvHD)</u>	10
1.2.2.4	<u>Cytomegalie-Virus-Infektion</u>	11
1.3	<u>Thrombozytenkonzentrate</u>	12
1.3.1	<u>Herstellung</u>	12
1.3.2	<u>Lagerung und Haltbarkeit</u>	13
1.3.3	<u>Qualitätskontrollen</u>	14
1.3.4	<u>Gebräuchliche Methoden der Leukozytenbestimmung in Blutprodukten</u>	17
1.4	<u>Zielsetzung und Fragestellung</u>	19
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	21
2.1	<u>Auswahl der Blutproben</u>	21
2.2	<u>Entnahme der Thrombozyten - Thrombozytapherese</u>	21
2.2.1	<u>Trima™ Blutkomponenten-Sammelsystem</u>	22
2.2.2	<u>Cobe Spectra™ Apheresesystem</u>	23
2.2.3	<u>Amicus Zellseparator</u>	24
2.3	<u>Versuchsdurchführung</u>	25
2.3.1	<u>Vorversuche (Verdünnungsreihen)</u>	25
2.3.2	<u>Durchflußzytometrische Messung</u>	26
2.3.2.1	<u>Aufbau und Prinzip eines Durchflußzytometers</u>	26
2.3.2.2	<u>CyFlow®</u>	28
2.3.2.3	<u>Messung</u>	31
2.4	<u>Präzisionskontrolle</u>	32
2.4.1	<u>SYSMEX</u>	32
2.4.1.1	<u>Gerät</u>	32
2.4.1.2	<u>Kontrollzählung</u>	33

2.4.2	Ballast-Zählkammer	34
2.4.2.1	Gerät	34
2.4.2.2	Kontrollzählung	36
2.4.3	CD45 Messung	36
2.4.3.1	Gerät	36
2.4.3.2	Kontrollzählung	36
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Vorversuche	38
3.1.1	Vollblut in Phosphatpuffer	38
3.1.2	Ungefilterte Erythrozytenkonzentrate in gefilterten Erythrozytenkonzentraten	39
3.2	CyFlow®	40
3.2.1	Übersicht	40
3.2.2	Dotplot-Darstellungen	41
3.2.3	Gegenüberstellung der einzelnen Apherese-Geräte	45
3.3	Präzisionsversuche	48
3.3.1	SYSMEX	48
3.3.2	Ballast-Zählkammer	49
3.3.3	Immunologischer Nachweis von Leukozyten (CD45 Messung)	50
	Statistische Auswertung	52
3.4	Zeit und Kostenaufwand	55
4	DISKUSSION	56
4.1	Bedeutung der quantitativen Leukozytenzählung in Thrombozytenkonzentraten	56
4.2	Validierung der Versuchsmethode	57
4.3	Präzisionsversuche	58
4.4	Vergleich der Zellseparatoren	66
5	ZUSAMMENFASSUNG	69
6	LITERATURVERZEICHNIS	71
7	LEBENS LAUF	80
8	DANKSAGUNG	81
9	ANHANG	I
9.1	Abbildungsverzeichnis	I
9.2	Tabellenverzeichnis	I

1 Einleitung

Die Transfusionsmedizin hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem sehr differenzierten Fach entwickelt, das eine Vielzahl von Blutkomponenten für verschiedenste klinische Anwendungen zur Verfügung stellt.

Die Herstellung, die Indikationsstellung und die Verwendung von Blut und Blutbestandteilen unterliegt deshalb strengen Anforderungen, die durch neue Erkenntnisse in der Immunhämatologie und Transfusionsmedizin ständig ergänzt oder ersetzt werden [34, 46].

Bei Blut und Blutkomponenten handelt es sich um Arzneimittel. Daraus ergeben sich zahlreiche Bestimmungen und behördliche Auflagen, die die Herstellung und Anwendung von Blutprodukten regeln [16, 17, 46].

Jede Transfusion kann, wie jede andere Organübertragung auch, dennoch unterschiedliche Gefahren, Komplikationen und auch Spätfolgen nach sich ziehen.

Deshalb ist der gezielte und gut überlegte Einsatz dieses „Arzneimittels“ für den Therapieerfolg des Patienten wichtig. Auch hier gilt der Leitsatz: so wenig wie möglich, soviel wie nötig! Nur so kann eine optimale Therapie bei gleichzeitiger bestmöglicher Beherrschung von Risiken erreicht werden.

Mit Hilfe einer verfeinerten Blutfraktionierung ist eine genauere Auftrennung des Blutes in die verschiedenen Zell- und Plasmaproteinkonzentrate möglich. So ist der Einsatz homologer Vollblutkonserven heute längst obsolet.

Stattdessen werden zunehmend einzelne Bestandteile, wie Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate, Frischplasma oder auch einzelne Gerinnungsfaktoren verwendet.

Dieses Vorgehen hat mehrere Vorteile:

- Medizinische Gründe: die Transfusion soll für die entsprechende Indikation so spezifisch wie möglich sein, um die Risiken zu minimieren

- Ökonomische Gründe: Kostenreduzierung durch Verwendung mehrerer Komponenten eines Spenders
- Lagerungstechnische Gründe: die verschiedenen Blutkomponenten weisen unterschiedliche Lagerungsoptima auf.

Wenn man diese Rahmenbedingungen beachtet, können biochemische Veränderungen, die oft eine Minderung der biologischen Wertigkeit bedeuten, reduziert oder zumindest verzögert werden [56]. Thrombozyten sind beispielsweise bei einer Temperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ fünf Tage haltbar.

1.1 Thrombozytentransfusion

1.1.1 Einsatzgebiet der Thrombozytentransfusion

Das Einsatzgebiet der Thrombozytentransfusion ist breit gefächert; insbesondere bei Thrombozytopenien, einigen Thrombozytopathien oder großen Blutverlusten findet diese Verwendung [7].

Auch bei Knochenmarkdepressionen kann die Zahl der Blutplättchen so stark reduziert sein, dass eine Substitution nötig wird. Solche thrombozytopenischen Zustände beobachtet man bei Leukämien, aggressiven Chemotherapien oder auch Knochenmetastasen.

Große chirurgische Eingriffe mit starken Blutverlusten können ebenfalls zum allogenen Thrombozytenersatz zwingen.

Liegt eine immunologische Destruktion der Thrombozyten zugrunde, so ist die Thrombozytenkonzentratgabe in aller Regel vergeblich. In diesen Fällen ist eine Transfusion nur bei lebensbedrohlichen Blutungen zu versuchen.

Zu bedenken ist bei jeder Thrombozytentransfusion, dass normalerweise etwa 65% der transfundierten Zellen in der Blutzirkulation bleiben; die restlichen 35% werden in der Milz sequestriert [7, 49].

Bei Vorliegen von Antikörpern gegen Thrombozyten gelingt die Substitution durch Transfusion von nichtkompatiblen Thrombozyten meist nicht; hier handelt es sich also um refraktäre Patienten. Bei einer disseminierten intravasalen Gerinnungsstörung kann die Verbrauchskoagulopathie durch Transfusion weiter unterhalten werden und zusätzlich Gefäßverschlüsse verursachen [23].

Eine exakte Grenze, ab welchen Thrombozytenwerten eine Substitution erforderlich ist, lässt sich nur schwer angeben. Die Entscheidung muss von Fall zu Fall erfolgen.

Einen weitgehend anerkannten Versuch, Richtlinien zur Thrombozytentransfusion aufzustellen, gibt der folgende Abschnitt 1.1.2.

1.1.2 Indikation der Thrombozytentransfusion

Als Hilfestellung bei der Entscheidung, eine Thrombozytentransfusion durchzuführen, kann die folgende Auflistung gelten [7, 23, 46].

- Thrombozytenzahl geringer als 20.000 – 10.000/ μl ohne weitere klinische Gefahrensignale
- Thrombozytenzahl geringer als 80.000 – 50.000/ μl bei manifester Blutung oder vor chirurgischen Eingriffen
- Manifeste Blutung und Verdopplung der Blutungszeit aufgrund von Thrombozytenfunktionsstörung
- Thrombozytenzahl auf einen Wert gefallen, bei dem derselbe Patient schon einmal eine hämorrhagische Blutung erlitten hat

Ein therapeutisch wirksamer Anstieg der Thrombozytenzahl kann folgendermaßen erreicht werden:

Erfahrungsgemäß wird bei einem normalgewichtigen Erwachsenen in stabilem klinischen Zustand durch Thrombozytenkonzentrate mit etwa 6×10^{10} Plättchen ein korrigiertes Inkrement von $6 - 8 \times 10^9 / \text{l}$ erzielt [7, 34].

1.2 Komplikationen bei der Thrombozytentransfusion

1.2.1 Allgemeine Komplikationen bei Bluttransfusionen oder Übertragung von Blutbestandteilen

Die Übertragung vitaler, jedoch nicht teilungsfähiger Blutzellen auf ein anderes Individuum wird als Transfusion bezeichnet. Hierbei kann es durch immunologische und/oder nicht-immunologische Reaktionen auf Seiten des Empfängers zu schwerwiegenden Komplikationen kommen.

Zu den immunologischen Reaktionen zählt man im engeren Sinne die Transfusionsreaktion, die Sensibilisierung und die Graft-versus-host Reaktion. Zu den nicht-immunologischen Reaktionen zählt unter anderem die Komplikation durch bakterielle Kontamination.

Zudem sind durch Blut übertragbare virale Infektionskrankheiten zu nennen. (z.B. HIV, Hepatitis B und C) [34]

Andere Risiken, wie z. B. die Gefahr der Eisenüberladung, sind nur bei häufig oder massiv transfundierten Patienten zu erwähnen.

1.2.1.1 Immunologische Transfusionsrisiken

Hämolytische Reaktionen

Unter hämolytischer Reaktion versteht man die Reaktion, die durch Alloantikörper gegen Erythrozyten (Blutgruppenantikörper) ausgelöst werden.

Der Begriff Immunhämolysen bezeichnet alle Formen des immunologisch bedingten Erythrozytenabbaus, schließt also intra- und extravasalen Erythrozytenabbau ein.

In der Immunhämatologie wird oft kurzerhand von hämolytischen Antikörpern gesprochen, obwohl Antikörper nicht selbst hämolysieren, sondern eine komplementbedingte Hämolysen induzieren können.[34]



Posttransfusionspurpura

Die Posttransfusionspurpura (PTP) wird durch thrombozytenspezifische Alloantikörper verursacht. Der häufigste für PTP verantwortliche Plättchenalloantikörper ist Anti-HPA-1a. Klinisch zeigt sich eine akute Thrombozytopenie und Blutungen.



Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)

TRALI ist eine dem „adult respiratory distress syndrome“ (ARDS) vergleichbare immunologisch ausgelöste Transfusionsreaktion. Sie hat im Vergleich zum ARDS trotz der Bedrohlichkeit dieser Reaktion eine bessere Prognose. Das Initialereignis bei TRALI ist die Reaktion von Alloantikörpern mit Granulozyten. Demzufolge sind zumeist Spender-Ak im Rahmen der Minorinkompatibilität für die Wechselwirkung mit den Granulozyten des Patienten verantwortlich: schwere pulmonale Komplikationen sind oft die Folge.



Allergische Reaktionen

Allergische Transfusionsreaktionen sind durch das klinische Bild definierte Reaktionen, für die im Spenderplasma gelöste Antigene verantwortlich gemacht, jedoch nur in seltenen Fällen nachgewiesen werden können. Die schwerste Form ist der seltene anaphylaktische Zwischenfall. Häufig sind urtikarielle Reaktionen.

Auch die febrile nicht-hämolytische Reaktion und Graft-versus-Host-Krankheit gehören zu den immunologischen Transfusionsrisiken. Sie werden unter Punkt 1.2.2 genauer erläutert.

1.2.1.2 Nicht-immunologische Transfusionsrisiken

Das Infektionsrisiko durch Gabe von Blutprodukten wird durch die vorgeschriebene intensive Testung des Spenders auf viele Erreger so gering wie möglich gehalten. Die Antikörpertestung versagt jedoch in der sogenannten diagnostischen Lücke nach frischer Infektion, wo es noch nicht zu einer Antikörperbildung gekommen ist.

Bei Plasmaprodukten wie FFP (fresh frozen plasma) oder Gerinnungsfaktorenkonzentraten werden Plasmabestandteile von vielen Spendern gemischt (gepoolt), was das Infektionsrisiko erhöht. Andererseits kann bei Plasmen entweder eine Quarantänelagerung oder eine Inaktivierung von Pathogenen erfolgen, um das Infektionsrisiko zu senken.

Bakterielle Kontamination:

Es ist nicht auszuschließen, dass einige Blutprodukte trotz intensiver Testung bakteriell besiedelt sind; sie dürfen deshalb nur über definierte Zeitabstände gelagert werden, um eine exponentielle Vermehrung und damit klinisch relevante Kontamination zu verhindern. Erythrozytenprodukte werden bei $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ gelagert [46]; hierbei wachsende Organismen sind selten invasiv, können jedoch Endotoxine bilden.

Ein erhöhtes Risiko geht dagegen von den bei Raumtemperatur gelagerten Thrombozytenpräparaten aus: hier kann es zu Übertragungen invasiver Organismen kommen.

Bei Übertragung kontaminierter Konserven kann es zu lebensbedrohlichen Krankheitsbildern kommen, die bis zum Multiorganversagen führen können [34].

1.2.1.3 Durch Blut übertragbare Infektionskrankheiten

Die Testung von Blut Spendern nach Anti-HIV-1 und -2 sowie Hepatitis B- und C-Antigenen sind mittlerweile obligat. Zusätzlich ist ein Ausschluß von HCV-RNA mittels PCR-Testung vorgeschrieben. Fakultativ wird zusätzlich auf den Cytomegalievirus getestet. Dieses ist im Hinblick auf immungeschwächte Patienten von großer Wichtigkeit.

Das Gesamtrisiko für eine tödliche Virusinfektion liegt bei 1: 260000 [52].

Humanes Immunodefizienz Virus (HIV)

Trotz intensiver Testung auf HIV kommt es in Deutschland dennoch jährlich zu drei bis fünf transfusionsassoziierten HIV-Infektionen. Dies entspricht circa 0,1% der jährlichen

HIV-Neuinfektionen (3000/Jahr). Bei insgesamt 80000 HIV-infizierten in der BRD entspricht dieses somit nur einem geringen Anteil [51].

Von 1482 neu erkrankten Patienten im Jahr 2001 werden drei Fälle dem Infektionsweg Transfusion zugeschrieben. Hierin eingeschlossen sind auch Empfänger von Organtransplantaten und im Ausland erhaltenen Transfusionen. Dies entspricht 0,2 % der Neuinfektionen im Jahr 2001. Im ersten Halbjahr 2002 wird keine der 600 Neuinfektionen auf eine Transfusion zurückgeführt [47].

KUBANEK ET AL. gaben 1993 ein geschätztes Restrisiko für DRK-Blutprodukte in Baden-Württemberg für HIV von 1:500.000 bis 1:1.000.000 an. Die Ermittlung der Prävalenz ergab einen Wert von 2/100.000 [24].

Hepatitis B und C:

Von noch größerer quantitativer Bedeutung sind die HBV- und HCV-Infektionen. Hier werden die jährlichen HCV-Neuinfektionen auf circa 10.000 geschätzt [51]. Die Häufigkeit von HCV-Antikörper positiven Spendewilligen beläuft sich auf 0,27 – 0,49 % [52]. Transfusionsassoziierte Neuinfektionen von Hepatitis-B-Antigenen konnten dank steigender Sensitivität des Screeningverfahrens auf ein Minimum reduziert werden. In einzelnen Fällen erfolgt trotz des sehr empfindlichen Tests, wenn auch sehr selten (1/50.000) eine Übertragung durch transfundiertes Blut [42].

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über das geschätzte Restrisiko von transfusionsassoziierten Virusinfektionen sowie die Einführung von Screeningtests bei Blutspendern.

Tabelle 1: Schätzung von Restrisiko/ Infektiosität transfusionsassoziiierter Virusinfektionen im Jahr 1991 [52]

Virus	Prävalenz in der Bevölkerung [%]	Screening bei Blutspendern	Risiko/ Blutkonserve
HIV	0,05 - 0,1	April 1985	500.000 – 3 Mio.
HCV	0,2 - 0,6	1990/1991	10.000 – 20.000
HBV	4 – 6	1970	20.000 – 40.000
Zytomegalievirus	50	(ja)	< 1000
Parvovirus B19	25	nein	800 - 4000

Eisenüberladung:

Bei häufig mit Erythrozyten transfundierten Patienten (zum Beispiel nach > 100 Transfusionen) kommt es zur Überladung mit Eisen. Dies lagert sich zunächst im retikuloendothelialen System ab, kann jedoch später in allen möglichen Geweben auftauchen und Zellfunktionsstörungen auslösen (Diabetes mellitus, Leberzirrhose, Kardiomyopathie). Transfusionen eines solchen Ausmaßes sind in der Regel nur bei Hämoglobinopathien nötig.

1.2.2 *Komplikationen durch Leukozytenkontamination*

1.2.2.1 **Sensibilisierung / Alloimmunisierung im HLA-System**

Jeder Mensch besitzt ein individuelles Muster an Oberflächenmolekülen, das primär für die Erkennung von Selbst und Nicht-Selbst verantwortlich ist und insofern für die Abstoßung genetisch unterschiedlicher Gewebe von hoher Relevanz ist. Sie werden als HLA-Moleküle (**H**uman **l**eucoocyte **a**ntigen) bezeichnet und sind auf den kernhaltigen Körperzellen exprimiert.

Jede Körperzelle (mit Ausnahme der kernlosen Erythrozyten) kann also anhand dieses HLA-Musters als körpereigen erkannt werden. Die HLA-Moleküle gehören zwei unterschiedlichen Klassen an. Sie sind beide genetisch im sogenannten major histocompatibility complex (MHC) auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 kodiert. HLA-Moleküle werden deshalb auch synonym als MHC-Moleküle bezeichnet.

Bei diesen beiden Klassen handelt es sich um

- *Klasse-I-HLA-Moleküle* (HLA-A,B und C), die praktisch auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und
- *Klasse-II-HLA-Moleküle* (HLA-D, mit Untergruppen HLA-DR, -DQ, -DP), die nur auf antigenpräsentierenden Zellen, also auf bestimmten Leukozyten (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten) präsentiert werden.

Sie befinden sich somit nicht auf Thrombozyten.

Antigen-präsentierende Zellen exprimieren somit sowohl Klasse-I- als auch Klasse-II-HLA-Moleküle, wohingegen Thrombozyten nur HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Die HLA-Moleküle sind genetisch stark polymorph, d.h. sie sind durch eine Vielzahl unterschiedlicher Allele kodiert.

Unter Alloimmunisierung versteht man die Bildung von Antikörpern gegen fremde Antigene. In diesem Fall die Bildung von HLA-Antikörpern gegen Antigene eines fremden major histocompatibility complex.

Als Voraussetzung für diesen Prozess ist das Vorhandensein von fremden Klasse I- und Klasse II -tragenden Zellen notwendig [10, 25, 48, 60].

Bereits 1981 konnten CLAAS ET AL. im Tiermodell zeigen, dass eine Thrombozyten-transfusion mit einer Leukozytenkontamination von 10^3 pro Transfusion eine Antikörperbildung beim Empfänger hervorruft. Bei Transfusion von Thrombozyten allein hingegen wurde keine Antikörperbildung beobachtet [10].

In weiteren Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Verwendung leukozytenarmer Thrombozytenkonzentrate eine Alloimmunisierung verhindern kann [35, 48, 54]. Die Folge der Alloimmunisierung ist die Refraktärität gegen allogene Thrombozyten.

Die Häufigkeit nimmt ab, wenn weniger als $2,5 - 5 \times 10^8$ Leukozyten pro Transfusionseinheit übertragen werden [21, 32].

SAARINEN ET AL. untersuchten 1990 die Inzidenz der Refraktärität gegen Thrombozyten, wobei immunsupprimierte Kinder entweder Standardblutpräparate oder leukozytenarme Präparate erhielten. Die Gruppe Kinder, die mit Standardblutpräparaten versorgt wurden, entwickelten in 52% der Fälle eine Refraktärität. Bei der anderen Gruppe, die weniger als 10^6 Leukozyten pro Einheit erhielten, entwickelte keiner eine Refraktärität [48].

SLICHTER ET AL. untersuchten 1997 in einer Multicenterstudie den Einfluß von leukozytenreduzierten Thrombozytenkonzentraten auf die Bildung von plättchenreaktiven Alloantikörpern und Refraktärität. Dabei zeigte sich, dass die Leukozytenreduktion durch Filtration genauso effektiv ist wie diejenige, die durch

Bestrahlung mit UVB-Licht erzielt wird. Außerdem wurde festgestellt, dass Thrombozytenkonzentrate von einem einzigen Spender im Gegensatz zu gepoolten Konzentraten von verschiedenen Spendern keine weiteren Vorteile mit sich bringen [57].

1.2.2.2 Febrile, nicht hämolytische Transfusionsreaktion (FNHTR)

Febrile, nicht hämolytische Transfusionsreaktionen sind Reaktionen mit Temperaturanstieg von mindestens 1°C, ohne dass Zeichen einer hämolytischen Reaktion oder Symptome anderer transfusionsbedingter Reaktionen vorliegen.

Als Ursachen febriler nicht hämolytischer Reaktionen werden Alloantikörper gegen transfundierte Leukozyten und Thrombozyten angenommen [6]. Die FNHTR äußert sich in Fieber, häufig begleitet mit Schüttelfrost. Das Fieber tritt in der Regel innerhalb der ersten zwei Stunden nach Transfusion auf. Das Fieber geht spontan zurück, das subjektive Empfinden der Patienten ist oft bedenklicher als die gute Prognose [34]. Neuere Arbeiten belegen übereinstimmend eine Korrelation zwischen Auftreten und Schweregrad febriler Reaktionen und dem Gehalt, insbesondere von Thrombozytenkonzentraten an Leukozyten, der Lagerungsdauer von Konserven und dem Gehalt an Zytokinen [2, 20, 38, 39].

1.2.2.3 Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Die immunologische Reaktion der mittransplantierten immunkompetenten Zellen wird als Graft-versus-Host-Disease (GvHD) bezeichnet. Häufig kommt sie bei immunsupprimierten Patienten vor.

Die Leukozyten des Spenders, speziell T-Lymphozyten, infiltrieren das lymphatische Gewebe des Empfängers. Durch das unterschiedliche HLA-Muster der Zellen des Empfängers werden die eingeschwemmten Leukozyten stimuliert und können prinzipiell alle Organe und Zellen angreifen. Meist tritt die GvHD ein bis vier Wochen nach Transfusion auf. Es sind verschiedene Erscheinungsformen in der Klinik möglich: Dermatitis, Hepatitis, Pneumonitis, Karditis oder auch ZNS-Befall. Therapeutisch werden Glukokortikoide und Immunsuppressiva eingesetzt [45]. Die Leukozyten-

Reduktion kann die Wahrscheinlichkeit einer GvHD reduzieren, aber nicht absolut verhindern. Dies ist nur durch Bestrahlung des Thrombozytenkonzentrates möglich.

1.2.2.4 Cytomegalie-Virus-Infektion

Der humane Zytomegalievirus (CMV) gehört der Gruppe der Beta-Herpesviren an und weist den typischen Aufbau der Herpesviren auf. Das doppelsträngige DNA-Genom des CMV kann in Granulozyten und Monozyten des Wirtes persistieren. Charakteristisch sind zytopathische Veränderungen infizierter Zellen mit einer Zunahme der Zellgröße und Bildung von Einschlusskörperchen im Kern und Zytoplasma.

Immunsupprimierte Patienten, die bisher nicht mit dem CMV in Kontakt gekommen sind und somit seronegativ sind, können sich über die leukozytenkontaminierten Thrombozytenkonzentrate seropositiver Spender infizieren.

Da die Prävalenz in der BRD mit 50% (Tabelle 1: Schätzung von Restrisiko/Infektiosität transfusionsassoziierter Virusinfektionen im Jahr 1991 [52]) sehr hoch liegt, muss mit einer solchen Infektion gerechnet werden. Das Krankheitsbild ist weit gefächert und erstreckt sich über Fieber, Pneumonie, Ösophagitis, Kolitis, Hepatosplenomegalie.

Auch eine Reaktivierung latenter Cytomegalieviren ist möglich [41].

MAZERON [30] konnte zeigen, dass das Risiko einer transfusionsassoziierten CMV-Infektion bei gefilterten Blutprodukten mit einem Restleukozytengehalt von weniger als 5×10^6 pro Einheit genauso gering ist wie das Risiko, das bei Blutprodukten seronegativer Spender vorherrscht.

Darüber hinaus scheint die Leukozytenreduktion die Reaktivierung latenter Cytomegalieviren zu reduzieren [30].

1.3 Thrombozytenkonzentrate

1.3.1 Herstellung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten:

- **Einzelspender-Thrombozytenkonzentrate:**

Dem Spender wird Vollblut entnommen, welches zunächst zentrifugiert wird. Anschließend werden das Plasma und die Erythrozyten abgetrennt und es folgt eine erneute Zentrifugation des buffy coats. Danach können die Thrombozyten im autologen Plasma oder in einem Gemisch von Plasma und Additivlösung für Thrombozyten resuspendiert werden [46].

- **Pool-Thrombozytenkonzentrat**

Bei dieser Methode werden ca. vier bis sechs ABO-blutgruppengleiche Buffy coats oder fertige Einzelspender-Thrombozytenkonzentrate zu einem sogenannten Pool-Thrombozytenkonzentrat zusammengeführt. Damit eine therapeutisch wirksame Dosis erreicht werden kann, ist dieses Vorgehen mit Hilfe eines funktionell geschlossenen Systems nötig [46]. Studien belegen jedoch eine erhöhte Zytokinfreisetzung durch derartig gepoolte Thrombozytenkonzentrate [50].

- **Leukozytendepletiertes Pool-Thrombozytenkonzentrat**

Das Herstellungsprinzip ist mit dem des Pool-Thrombozytenkonzentrats zu vergleichen. Hier erfolgt jedoch zusätzlich eine Leukozyten-Filtration innerhalb des funktionell geschlossenen Systems [46].

- **Apherese-Thrombozytenkonzentrat**

Hier werden mittels Apherese gezielt Bestandteile aus dem Spenderblut gesammelt, entweder durch die Thrombozytenapherese oder durch Multikomponentenspende [46].

- **Leukozytendepletiertes Apherese-Thrombozytenkonzentrat:**

Die Depletion der Leukozyten schließt sich entweder der Apherese an oder erfolgt direkt als integrierte Leukozytendepletion während des Aphereseverfahrens. Das Leukozyten-Reduktions-System wird im Abschnitt 2.2.2 genauer beschrieben [46].

- **Bestrahltes Thrombozytenkonzentrat**

Vorzugsweise sollen leukozytendepletierte Thrombozytenkonzentrate bestrahlt werden, die abhängig von der Herstellung jeweils die Spezifikationen der unbestrahlten Präparate aufweisen. Die Bestrahlung erfolgt mit einer mittleren Dosis von 30 Gy und darf an keiner Stelle des Präparates die Dosis von 25 Gy unterschreiten [46].

1.3.2 Lagerung und Haltbarkeit

Die optimalen Lagerungsbedingungen sind bei Thrombozytenkonzentraten, unabhängig von der Art der Herstellung, gleich.

Unter ständiger Agitation des Präparates sollte eine Lagerungstemperatur von $+ 22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ eingehalten werden [46].

Die Lagerungszeit sollte möglichst kurz sein, das heißt also, je kürzer die Zeit zwischen Entnahme und Transfusion um so besser [55]. Sie darf maximal fünf Tage nach der Spende betragen und ist abhängig von dem Herstellungsverfahren und den verwendeten Lagerbeuteln [46].

Der pH-Wert des Suspensionsmediums sollte zwischen 6,5 und 7,2 liegen [53]. In erster Linie trägt der Stoffwechsel der Thrombozyten zu einem kritischen Abfall des pH-Wertes bei. Diese produzieren nämlich unter anaeroben Bedingungen während der Lagerung in Plastikbeuteln Laktat. Dieser Effekt ist umso ausgeprägter, je höher konzentriert die Thrombozytenpräparate sind. Aus diesem Grund konnte früher nur plättchenreiches Plasma gelagert werden [37].

Damals kamen noch Beutel aus PVC zum Einsatz. In der folgenden Zeit bemühte man sich, Beutel aus möglichst gasdurchlässigem Kunststoff zu entwickeln und kam zum Polyethylen. Außerdem wurden Versuche mit PVC-Folien und Tri-(2-ethylhexyl)-

trimelitat (TOTM) als Weichmacher durchgeführt (Beutel der zweiten Generation) [36, 37].

Grund für diese Überlegungen war die Tatsache, dass in die Beutel diffundierender Sauerstoff durch den Pasteur-Effekt die anaerobe Glykolyse und somit auch die Laktatproduktion hemmt. Außerdem kann das durch die Reaktion der Wasserstoffionen mit dem Bikarbonat des Plasmas entstehende CO₂ abdiffundieren.

Eine ständige leichte Bewegung ist zur besseren Erhaltung von Struktur, Lebensdauer und Funktion der gelagerten Thrombozyten notwendig. Als Mechanismus wird die möglichst rasche Entfernung von schädlichen Stoffwechselprodukten aus der direkten Umgebung der Thrombozyten vermutet.

Auch zum optimalen Mischverfahren liegen Untersuchungen hinsichtlich Stärke, Frequenz, Bewegungsart vor. So sollen Agitatoren eine horizontale Pendelbewegung oder Rotationen ausführen. Insgesamt muss man aber sagen, dass all diesen Überlegungen nur eine sehr untergeordnete klinische Bedeutung zukommt [1].

1.3.3 Qualitätskontrollen

Blutprodukte sind Arzneimittel im Sinne von § 2 (1) AMG i. V. mit § 2 Nr. 3 TFG und unterliegen in Herstellung und Qualitätsprüfung den gesetzlichen Vorschriften des Arzneimittelgesetzes (AMG) und der Pharmabetriebsverordnung (PharmBetrV). Weiterhin ist bei ihrer Herstellung die Einhaltung der Empfehlungen des Europarates und der Weltgesundheitsorganisation sowie die „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ der Bundesärztekammer zu beachten [5, 16].

Für die einzelnen Arten von Thrombozytenkonzentraten sind verschiedene Formen von Qualitätskontrollen veröffentlicht worden [19, 46].

Die monatliche Prüffrequenz der Qualitätskontrollen beträgt 1% der hergestellten Einheiten, mindestens aber vier Einheiten. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die durchzuführenden Qualitätskontrollen bei den einzelnen Präparaten:

Tabelle 2: Qualitätskontrollen bei **Einzelspender-Thrombozytenkonzentraten**

PRÜFPARAMETER	PRÜFKRITERIUM	PRÜFZEITPUNKT
Volumen	>40 ml nach Festlegung	nach Herstellung
Thrombozytenzahl	>60 x 10 ⁹ / Einheit*	nach Herstellung
Restleukozyten	< 0,5 x 10 ⁸ / Einheit*	nach Herstellung
Resterythrozyten	< 0,5 x 10 ⁹ / Einheit	nach Herstellung
pH-Wert	6,5 - 7,4	am Ende der Haltbarkeit
Visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt, „swirling“	am Ende der Haltbarkeit
Sterilität	Steril	am Ende der Haltbarkeit

*Diese Anforderungen sollen 75% der geprüften Einheiten erfüllen.

Tabelle 3: Qualitätskontrollen bei **leukozytendepletierten Pool-Thrombozytenkonzentraten**

PRÜFPARAMETER	PRÜFKRITERIUM	PRÜFZEITPUNKT
Volumen	>40 ml in Abhängigkeit von der Anzahl der gepoolten Einheiten	nach Herstellung
Thrombozytenzahl	>60 x 10 ⁹ / in Abhängigkeit von der Anzahl der gepoolten Einheiten*	nach Herstellung
Restleukozyten	< 1 x 10 ⁶ / in der gepoolten Einheit*	nach Herstellung
Resterythrozyten	< 0,5 x 10 ⁹ / in Abhängigkeit von der Anzahl der gepoolten Einheiten	nach Herstellung
pH-Wert	6,5 - 7,4	am Ende der Haltbarkeit
Visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt, „swirling“	am Ende der Haltbarkeit
Sterilität	Steril	am Ende der Haltbarkeit

*Diese Anforderungen sollen 90% der geprüften Einheiten erfüllen

Tabelle 4: Qualitätskontrollen bei **Apherese-Thrombozytenkonzentraten**

PRÜFPARAMETER	PRÜFKRITERIUM	PRÜFZEITPUNKT
Volumen	>200 ml	nach Herstellung
Thrombozytengehalt	>200 x 10 ⁹ / Einheit	nach Herstellung
Thrombozyten/ ml	Nach Festlegung, ermittelt abhängig von Lagerbedingungen	nach Herstellung
Restleukozyten	< 1 x 10 ⁹ / Einheit*	nach Herstellung
Resterythrozyten	< 3 x 10 ⁹ / Einheit	nach Herstellung
pH-Wert	6,5 - 7,4	am Ende der Haltbarkeit
Visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt, „swirling“	am Ende der Haltbarkeit
Sterilität	Steril	am Ende der Haltbarkeit

*Diese Anforderungen sollen 75% der geprüften Einheiten erfüllen.

Tabelle 5: Qualitätskontrollen bei **leukozytendepletierten Apherese-Thrombozytenkonzentraten**

PRÜFPARAMETER	PRÜFKRITERIUM	PRÜFZEITPUNKT
Volumen	>200 ml	nach Herstellung
Thrombozytengehalt	>200 x 10 ⁹ / Einheit	nach Herstellung
Thormbozyten/ ml	Nach Festlegung, ermittelt abhängig von Lagerbedingungen	nach Herstellung
Restleukozyten	< 1 x 10 ⁶ / Einheit*	nach Herstellung
Resterythrozyten	< 3 x 10 ⁹ / Einheit	nach Herstellung
pH-Wert	6,5 - 7,4	am Ende der Haltbarkeit
Visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt, „swirling“	am Ende der Haltbarkeit
Sterilität	Steril	am Ende der Haltbarkeit

*Diese Anforderungen sollen 90% der geprüften Einheiten erfüllen

1.3.4 Gebräuchliche Methoden der Leukozytenbestimmung in Blutprodukten

Die Zählung von Leukozyten in Blutprodukten erfolgt nach verschiedenen Methoden, die sich durch unterschiedliche Genauigkeiten, aber auch durch unterschiedlich hohen apparativen und zeitlichen Aufwand voneinander unterscheiden.

Die Sensitivität in der Literatur anerkannter Leukozytennachweisverfahren ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Vergleich der Sensitivitätsgrenzen gebräuchlicher Bestimmungsmethoden der Leukozytenzahl in Blutprodukten [27]

Meßmethode	Untere Sensitivitätsgrenze/ µl Blut
Automatische Zählmethoden	100 Leukozyten
Mikroskopische Methoden:	
• Neubauer-Kammer	2,8 Leukozyten
• Ballastzählkammer	0,2 Leukozyten
Durchflußzytometrie	0,2 Leukozyten
PCR	0,002 Leukozyten

Die in Abschnitt 1.3.3 dargestellten Richtlinien zur Qualitätskontrolle schreiben vor, dass leukozytendepletierte Apherese-Thrombozytenkonzentrate höchstens 1×10^6 Leukozyten/ Einheit enthalten dürfen. Es wird also eine Methode benötigt, die in dem Bereich von < 4 Leukozyten pro Mikroliter Blutpräparat zuverlässige Ergebnisse liefert. Standardmethode ist die Zählung in der Ballastzählkammer mit einer Nachweisgrenze von 0,2 Leukozyten/µl [26, 27, 29].

In anderen Untersuchungen zeigte sich, dass die manuelle Leukozytenzählung in der Ballastzählkammer nur bei Konzentrationen bis niedrigstenfalls 2 Zellen pro µl effizient ist, besteht man auf einem gewissen Maß an Genauigkeit (Variationskoeffizient $< 25\%$) [12].

Erste Veröffentlichungen, die die Verwendung des Durchflußzytometers für die Leukozytenzählung beschreiben, erschienen 1984 [59]. In den darauffolgenden Jahren stieg die Anzahl der Studien auf diesem Gebiet stetig. Der Einsatz der

Durchflußzytometrie bietet gegenüber dem mikroskopischen Verfahren den Vorteil der Automatisierungsmöglichkeit und größeren Standardisierbarkeit der Untersuchung. Außerdem ist der mit 2 min deutlich geringere Zeitaufwand beim Arbeiten mit dem Durchflußzytometer im Vergleich zur Ballastzählkammer mit 20 bis 30 min pro Einzelmessung zu erwähnen [8,40].

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht einen wesentlichen Aspekt der Qualitätssicherung bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten. Dabei spielt die Zählung von Restleukozyten in den Blutprodukten die zentrale Rolle.

Die vom COUNCIL OF EUROPE festgesetzte Prüfung von mindestens 1 % [19] aller Thrombozytenkonzentrate wird bis heute mit der Ballastzählkammer durchgeführt.

Diese Methode ist zum einen sehr zeitaufwendig, zum anderen kann die Zählung durch subjektive Faktoren wie mangelnde Aufmerksamkeit oder individuelle Erfahrung negativ beeinflusst werden und somit fehlerhafte Ergebnisse liefern. Die hohe Variabilität einzelner Labore untereinander ist kritisch zu sehen.

Die vorgeschriebene Leukozytenkontamination von maximal 1×10^6 Leukozyten pro Einheit (entspricht ca. 4 Leukozyten/ μl Blut) steht einer tatsächlichen Nachweisgrenze der Ballastzählkammer von 2 - 4 Zellen/ μl Blut gegenüber [12]. Damit befindet man sich bereits im Grenzbereich der Nachweisbarkeit dieser offiziell verwendeten Kontrollmethode.

Somit ergeben sich folgende Fragestellungen:

1) Reicht die vorgeschriebene Prüfung von mindestens 1 % der Proben aus, um vermutliche Leukozytenkontaminationen statistisch sicher zu erfassen?

Um eine konkrete Vorstellung zu bekommen, wie viele Ausreißer in einer bestimmten Anzahl von Blutprodukten tatsächlich vorhanden sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit 991 Thrombozytenkonzentrate auf ihren Leukozytenrestgehalt gemessen.

2) Ist die Ballastzählkammer für eine sichere und schnelle Quantifizierung von Leukozyten überhaupt geeignet?

Dies ist im Hinblick auf die folgenschweren Komplikationen durch Leukozytenkontamination in Thrombozytenkonzentraten [siehe 1.2.2] von höchster Wichtigkeit.

3) Gibt es Alternativen für diese Kontrollzählungen?

Bei dieser Arbeit wurde die Durchflußzytometrie, die eine automatische Zellzählung bietet, als Alternative geprüft. Durch das hohe Nettoprobenvolumen von 20-50 μl liegt die Nachweisgrenze hier bei 0,05-0,02 Zellen/ μl [12]. Die Ballastzählkammer besitzt dagegen nur ein Nettoprobenvolumen von maximal 2 x 5 μl .

4) Liefern die verschiedenen Typen von Zellseparatoren, die im Arbeitsbereich Blutspende/ Hämapherese des Universitätsklinikums der Westfälischen Wilhelms-Universität Verwendung finden, gleiche und ausreichend gute Ergebnisse bezüglich der Anzahl der Restleukozyten in den Thrombozytenkonzentraten?

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl der Blutproben

Im Arbeitsbereich Blutspende/ Hämapherese des Universitätsklinikums der Westfälischen Wilhelms-Universität werden täglich etwa 25 bis 30 Thrombozytenkonzentrate durch Thrombozytapherese gewonnen.

Hierbei handelt es sich um Präparate von freiwilligen Spendern, die sich gegen eine Aufwandsentschädigung Blutplättchen entnehmen lassen.

In unserer Untersuchung wurden insgesamt 991 Thrombozytenkonzentrate auf ihren Leukozytengehalt hin durchflußzytometrisch untersucht.

2.2 Entnahme der Thrombozyten - Thrombozytapherese

Im Universitätsklinikum der Westfälischen Wilhelms-Universität finden drei unterschiedliche Zellseparationssysteme Verwendung.

Hierbei sind die kontinuierliche und diskontinuierliche Technik zu unterscheiden.

Bei dem sogenannten kontinuierlichen Verfahren werden zwei Venen des Spenders punktiert. Unter fortlaufender Entnahme von Vollblut aus der einen Vene und Rückgabe von Erythrozyten und Plasma in die andere Vene erfolgt die Auftrennung der Blutbestandteile durch Zentrifugation.

Bei dem diskontinuierlichen Verfahren wird nur eine Vene des Spenders punktiert. Hierbei wird mehrmals ein Blutvolumen von ca. 200 – 300 ml abgenommen und durch Zentrifugation in seine Bestandteile aufgetrennt. Erythrozyten und Plasma werden dem Spender durch die gleiche Vene zu einem späteren Zeitpunkt reinfundiert. Dieser Vorgang wird etwa 6 bis 8 mal wiederholt, bis genügend Thrombozyten gesammelt sind.

Im folgenden werden das Trima™ Blutkomponentensammelsystem, das Cobe Spectra™ Apheresesystem und der Amicus Zellseparator näher beschrieben:

2.2.1 Trima™ Blutkomponenten-Sammelsystem

Das automatische Trima™ Blutkomponenten-Sammelsystem ist ein mobiles automatisiertes System, das mit Hilfe einer Zentrifuge Vollblut in seine Hauptkomponenten separiert. Kombinationen von Thrombozyten, Plasma und Erythrozyten werden in Beuteln gesammelt, die restlichen Komponenten werden an den Spender rückgeführt.

Das Trima™ Sammelsystem verwendet fünf Pumpen, die sich auf der Frontplatte befinden: Zufluss-, Antikoagulant-, Thrombozyten-, Plasma- und Rückflussspumpe.

Während des Sammelverfahrens werden Antikoagulant und Vollblut am Verteiler in der Nähe der Punktionsstelle vermischt. Das Blut und Antikoagulantgemisch werden von der Zuflussspumpe in das System gesogen und fließen in den Kanal. Während das Vollblut im Kanal getrennt wird, werden die Thrombozyten und das Plasma von den entsprechenden Pumpen abgesammelt. Die Erythrozyten werden durch den Druck, der dadurch entsteht, dass kontinuierlich Spenderblut in die Zentrifuge gepumpt wird, aus dem Kanal gedrängt.

Je nach der ausgewählten Methode werden die Thrombozyten, das Plasma und die Erythrozyten in Präparatebeuteln gesammelt oder an das Rückflussreservoir geleitet und zum Spender zurückgeführt.

Wenn das Rückflussreservoir ein ausreichendes Volumen enthält, wird die Rückflussspumpe aktiviert. Der Inhalt des Rückflussreservoirs wird an den Spender zurückgeführt, bis die Blutmenge den unteren Füllstandsensor des Reservoirs erreicht. Während der Sammlung von Thrombozyten und Plasma behält die Zuflussspumpe eine konstante Geschwindigkeit bei und eine geringe Menge des zurückfließenden Blutes wird durch den Zuflussschlauch zurück in den Kanal gesogen.

Mittels dieses rezirkulierten Blutes kann das Trima™ Sammelsystem einen kontinuierlichen Blutfluss durch den Kanal aufrecht erhalten. Während eines

Plasmaerythrozytenverfahrens regelt die Thrombozytenpumpe die kontinuierliche Gabe von Volumenersatzflüssigkeit sowie die Gabe eines Flüssigkeitsbolus.

2.2.2 Cobe Spectra™ Apheresesystem

Das Spectra™ Apheresesystem dient ebenfalls zur Trennung und Sammlung von Blutkomponenten von Spendern und Patienten nach dem kontinuierlichen Verfahren.

Thrombozytensammlung und Plasmaaustausch können hierbei im Zweinadelbetrieb (eine Zuflussnadel und eine getrennte Rückflussnadel) oder im Einnadelbetrieb (eine Zufluß-/ Rückflußnadel) erfolgen. Im Arbeitsbereich Blutspende/ Hämapherese der Universitätsklinikum der Westfälischen Wilhelms-Universität findet ausschließlich der Zweinadelbetrieb Verwendung.

Das Spectra System besteht aus dem Einwegset (vorbefestigter Trennkanal und Blutschläuche) und dem Spectra Apheresesystem. Das System umfasst folgende Komponenten:

- 1) Spectra Einwegset – bestehend aus einem sich in der Zentrifuge drehenden Trennkanal zur Auftrennung von Blut in dessen Bestandteile und aus Blutschläuchen, in denen Blut und Ersatzflüssigkeiten durch das System geleitet werden.
- 2) Spectra Apheresesystem – ein auf dem Zentrifugenprinzip basierender automatischer Blutkörperchenseparator, der die Steuerung und Überwachung des extrakorporalen Kreislaufs bei der Apherese übernimmt.

Das im Arbeitsbereich Blutspende/ Hämapherese des Universitätsklinikums benutzte Spectra Einwegset ist ein Langzeit-Thrombozytenset mit LRS(Leukozytenreduzierungssystem)-Kammer für Zweinadelbetrieb. Hierbei handelt es sich um ein funktionsmäßig in sich geschlossenes Set zur Sammlung von Einzelspenderthrombozyten oder zur therapeutischen Thrombozytendepletion. Dieses Set besteht aus einem Zweiphasen-Thrombozytenkanal, einer LRS-Kammer und einem

Blutschlauchsystem für Thrombozyten und ist für den Einsatz mit LRS-Zweinadelprinzip konzipiert.

- Der Zweiphasen-Thrombozytenkanal sammelt Thrombozyten und bei Bedarf Plasma mit geringer zellulärer Kontamination. Dies erfolgt in zwei Phasen: Trennung von Thrombozyten, Plasma und roten und weißen Blutkörperchen mit anschließender Konzentrierung der Thrombozyten durch Reduzierung des Plasmavolumens.
- Die LRS-Kammer (leukozytenreduzierendes System) führt die endgültige Trennung der Leukozyten von den Thrombozyten vor dem Transport der Thrombozyten von der LRS-Kammer in den Sammelbeutel durch. Bei diesem auf Zentrifugation basierendem System ist kein Leukozytenfilter nötig.
- Der Langzeitthrombozytenschlauch sammelt Thrombozyten zur Langzeitlagerung und bei Bedarf Plasma mit Hilfe eines funktionsmäßig geschlossenen Kreislaufs, der aus Schläuchen, Zuflussnadel, Rückflussnadel, Thrombozytensammel-beuteln, Plasmasammelbeuteln und Filtern (Sterilfilter für die Flüssigkeitszuleitungen) besteht.

Gemäß der Bedienungsanleitung sollen unter Verwendung dieses Systems Einzelspenderthrombozyten mit einem Leukozyten-Kontaminationsniveau unter 1×10^6 gesammelt werden können.

2.2.3 Amicus Zellseparator

Der Amicus Zellseparator ist ein Gerät mit einer Zentrifuge mit kontinuierlichem Fluss und dient zur Separation von Vollblut in seine Bestandteile: Thrombozyten, Plasma, Erythrozyten und mononukleäre Zellen. Blutkomponenten werden mit sterilen Einmal-Apherese-Sets gesammelt. Die Zellen werden aufgrund von Unterschieden in der Dichte mittels Zentrifugalkraft getrennt.

Das Gerät arbeitet vollautomatisch und verfügt über Hardwarekomponenten und Einmalsetkomponenten.

Die Betriebsbereiche gliedern sich in einen Berührungsbildschirm, mit dem der Zellseparator vom Anwender gesteuert wird, in die Geräteoberseite, in die das Apherese-Set-Tablett eingelegt wird und in einen Zentrifugenraum, in dem die eigentliche Separation stattfindet.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Vorversuche (Verdünnungsreihen)

Zur Validierung der Versuchsmethode bei niedrigen Leukozytenzahlen wurden verschiedene Verdünnungsreihen durchgeführt. Durch Abgleich von Soll und Istwert wird die Richtigkeit bestimmt. Als Referenzmethode zur Bestimmung des Sollwertes galt die Zählung durch das Hämatologie-Analysengerät SYSMEX K-1000 [Absatz 2.4.1]. Hohe Verdünnungen mit niedrigen Leukozytenkonzentrationen dienen zur Bestimmung der Sensitivität. Durch wiederholte Messungen kann mit dem Variationskoeffizienten eine Aussage zur Reproduzierbarkeit der Messmethode gemacht werden.

Folgende Verdünnungsreihen wurden angesetzt:

Vollblut in Phosphatpuffer

Hierzu wurde Vollblut in Verdünnungsstufen von 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 und 1:10000 mit isotonem Phosphatpuffer angesetzt.

Als Leukozyten-Marker wurde die DAPI-Farbstoff Lösung (Cystain R, Firma Partec, Münster) verwendet. Der Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol bindet sich an die DNA und kennzeichnet so alle kernhaltigen Zellen fluoreszierend. Werden die so vorbereiteten Proben mit Licht zwischen 340 und 380 nm angeregt, fluoreszieren sie in kräftigem Hellblau (450 nm).

0,1 ml jeder Probe wurden in einem Reagenzglas mit 0,9 ml DAPI versetzt. Dies geschah mit Hilfe einer automatischen Pipette (Eppendorf, Hamburg), wobei die Messspitze nach jedem Schritt gewechselt wurde.

Es wurde ein Vortex-Gerät (Vortex-Genie Winn) verwendet.

Die Leukozytenkonzentration für jede verdünnte Probe wurde innerhalb von drei Minuten mit dem Durchflußzytometer bestimmt. Dieser Zeitraum wurde exakt eingehalten, da eine Verzögerung zu vorzeitiger Lyse und somit Meßungenauigkeiten führt.

Dieser Vorversuch wurde mit zwei unterschiedlichen Vollblutproben durchgeführt.

Ungefilterte Erythrozytenkonzentrate (EK) in gefilterten Erythrozytenkonzentraten

In dieser Versuchsreihe wurden ungefilterte EKs in Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 und 1: 10000 mit gefilterten EKs versetzt.

Wie bei den beiden ersten Vorversuchen wurde mit DAPI als DNA-Marker gearbeitet. 0,9 ml DAPI wurde mit 0,1 ml der jeweils verdünnten Probe versetzt.

Analog wurde mit der Eppendorfpipette und dem Vortex-Gerät gearbeitet. Die Leukozytenzahl wurde innerhalb von drei Minuten mit dem Durchflußzytometer gemessen, beginnend mit der höchsten Verdünnungsstufe.

2.3.2 Durchflußzytometrische Messung

2.3.2.1 Aufbau und Prinzip eines Durchflußzytometers

Im Gegensatz zu einem Mikroskop, in dem verschiedenartige Zellen statisch untersucht werden, beruht das Durchflußzytometer auf einem anderen Prinzip, da es in der Lage ist, Zellen in Bewegung, also im Fluss auszuwerten.

Es analysiert Streulicht und Fluoreszenzsignale in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel.

Zunächst werden die Zellen mit einem fluoreszierenden Stoff versetzt, der die eigentliche Erkennung kernhaltiger Zellen und deren Zählung durch Erfassung des Fluoreszenzlichts jeder einzelnen Zelle erst möglich macht.

2.3.2.2 CyFlow®

Die beschriebenen Messungen wurden mit dem CyFlow® der Firma Partec, Münster, Deutschland durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein portables Durchflußzytometer, das in der Standardausführung mit fünf optischen Parametern (FSC, SSC und 3x Fluoreszenzlicht) ausgerüstet ist. In den hier durchgeführten Versuchen wurde ein mit einer UV-Lampe bestücktes Gerät benutzt.



Abbildung 2: CyFlow® der Firma Partec, Münster, Deutschland

An das CyFlow® wurde ein PC mit Pentiumprocessor angeschlossen mit mind. 1000 MHz Taktrate und 128 MB RAM. Die Windows-basierte FloMax® Software ermöglichte die Zellzählung und graphische Aufarbeitung in Echtzeit. Die Fluoreszenzsignale wurden in Form von Histogrammen und Dotplot-Diagrammen dargestellt:

1-Parameter Histogramme

In diesen Histogrammen oder Häufigkeitsverteilungen werden die Messdaten sehr einfach dargestellt. Die Lichtintensität einzelner Zellen und somit die Menge der zu untersuchenden Substanz wird einer Quantitätsklasse („Kanal“) zugewiesen. Diese Klassifizierung erfolgt, während die Zellen analysiert werden.

Die bei einer Messung gewonnenen digitalisierten Werte können zum Beispiel bei einer Auflösung von 1024 Klassen Werte von 0 bis 1023 einnehmen. In einem Histogramm

sind die Zellzahlen auf der Y-Achse gegen die Klassen („Kanäle“) auf der X-Achse aufgetragen. Somit kann man sich die Messwerte als Kugeln, die in einzelne Register fallen, vorstellen.

Dabei entstehen sogenannte „Peaks“ (Gipfel). Alle Zellen, die zu einem solchen Peak gehören, liefern eine ähnliche Fluoreszenzlichtintensität.

Diese Fluoreszenzlichtintensität korreliert im Fall einer DAPI-Färbung positiv mit dem DNA-Gehalt der Zellen. Alle Zellen mit dem gleichen DNA-Gehalt erscheinen somit im gleichen Kanal. In unserem Fall wird der „G1-Peak“ auf einen Kanalbereich von 100-150 eingestellt. Die Zellen in diesem Kanalbereich präsentieren somit Leukozyten mit dem diploiden DNA-Gehalt im Zellkern.

Als „Noise“ bezeichnet man Signale in den niedrigen Kanälen. Diese können von elektrischen Störungen, Zellfragmenten oder anderen Partikeln herrühren. Um zu vermeiden, dass zu hohe Anteile an „Noise“-Signalen gemessen werden, wird ein „Lower Level“ festgelegt. Der „L-L“ stellt eine Schwelle dar, unter der Signale nicht mehr im Histogramm dargestellt werden.

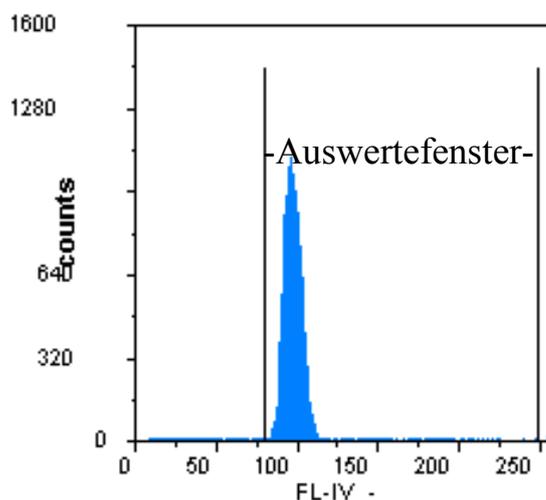


Abbildung 3: Beispiel für ein 1-Parameter-Histogramm

Korrelierte 2-Parameter Dotplots

Wenn die DAPI- Fluoreszenz jeweils bei zwei vorgegebenen Wellenlängen gemessen wird, erhält man eine korrelierte 2-Parameterdarstellung.

Zum einen ist auf der X-Achse (FL-IV) die kurzwellige Fluoreszenz bei Wellenlänge 455 nm, und zum anderen auf der Y-Achse (FL-II) die längerwellige Fluoreszenz bei Wellenlänge 570 nm dargestellt. Jede Zelle mit einer bestimmten Fluoreszenzlichtintensität wird durch einen Punkt („dot“) im Dotplot dargestellt. Aus der gegenseitigen Auftragung der Klassenwerte von zwei Parametern entsteht eine Matrix. Ihre Struktur oder Auflösung entspricht der Klassifizierungsbreite der Parameter. Verschiedene Zellen mit den gleichen FL-IV- und FL-II-Werten nehmen im Diagramm die gleiche Stelle, also den gleichen „dot“ an. Diese gegenseitige Darstellung ermöglicht eine bessere Abgrenzung zu anderen fluoreszierenden Partikeln.

Gating

In einem 2-Parameter Dotplot erscheinen Zellpopulationen mit annähernd ähnlichen Eigenschaften als Punktwolken („Cluster“). Diese Punktwolken können genauer analysiert werden, indem man sie durch Rechtecke eingrenzt und somit Auswertefenster definiert. Dieser Vorgang, einzelne Zellcluster genauer zu untersuchen, nennt sich „gating“. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden alle in das Auswertefenster fallenden Fluoreszenzsignale als intakte kernhaltige Zellen gewertet und gezählt.

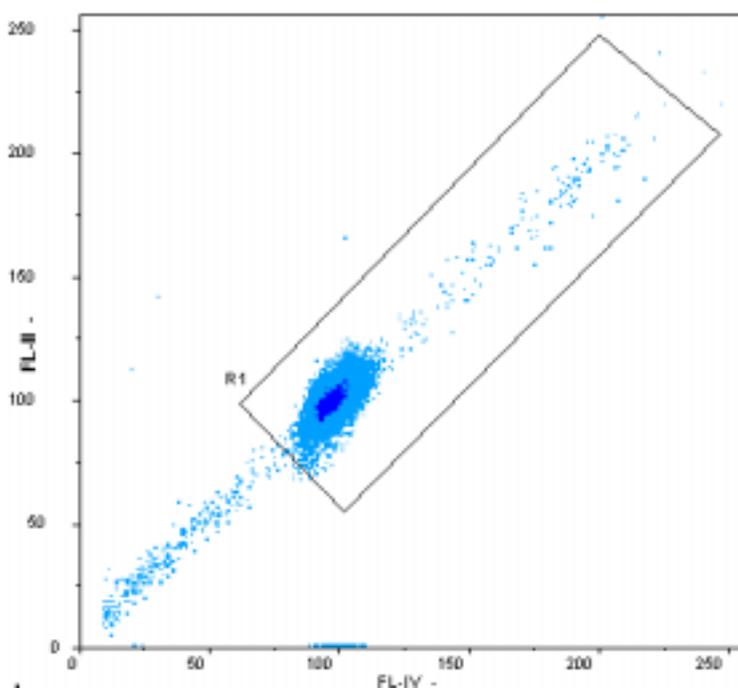


Abbildung 4: Beispiel für ein korreliertes 2-Parameter Dotplot nach dem Gating

Nach einer Kernfärbung mit DAPI wurde die Vollblutprobe mit dem Flowzytometer gemessen. DNA-haltige Zellen befinden sich im Bereich des Auswertefensters. Dieses wurde zu Beginn unserer Untersuchung definiert und dann für die Analyse aller weiteren Thrombozytenkonzentrate verwendet.

2.3.2.3 Messung

Von jedem Thrombozytenkonzentrat wurde eine repräsentative Probe von 2-3 ml steril abgenommen und für die Messungen am Durchflußzytometer verwendet.

0,1 ml der Blutprobe wurde mit 0,9 ml DAPI-Farbstoff versetzt.

Nach gründlicher Durchmischung erfolgte die durchflußzytometrische Messung im CyFlow®. Die Leukozyten waren nur ca. 10 Minuten im Färbepuffer stabil.

Ein Probenröhrchen wurde unter Vermeidung von Luftblasenbildung mit 1300 µl der aufbereiteten Probe gefüllt. Nach dem Einrasten begann automatisch die Messung. Die FloMax-Software zeigte folgende Mess-Stadien an:

In der „Prerun-Phase“ wurde der Probenstrom mit hoher Geschwindigkeit zur Messküvette transportiert. Während der „Stabilize-Phase“ wurde die Geschwindigkeit deutlich gedrosselt, so dass sich das Messsystem stabilisieren konnte. In der „Run-Phase“ wurden die Zellen analysiert und in Echtzeit in Histogrammen auf dem Display dargestellt. Erst in der „Count-Phase“ erfolgte dann die Zellzählung in einem definierten Volumen von 500 µl.

Die Anzeige und statistische Auswertung konnte durch das Definieren von Auswertefenstern auf solche Messsignale reduziert werden, die ausschließlich von kernhaltigen Zellen stammten (markiertes Fenster in der Abbildung 4).

Die Fluoreszenzsignale aller G₁-Zellen (Stadium der Interphase des Zellzyklus) wurden so verstärkt, dass sich die Signale im Bereich von Kanal 100 fanden. Etwa bei Kanal 200 wurden einige wenige Signale aufgezeichnet, die G₂-Zellen oder Zellpaare repräsentierten. Der Prozentsatz lag üblicherweise unter 2 %.

Alle Signale zwischen Kanal 85 und 250 wurden durch ein Fenster markiert und ausgewertet („gated“).

Signale unterhalb von Kanal 85 entstehen entweder durch Leukozytenbruchstücke oder durch andere fluoreszierende Partikel, die weniger DNA als G₁-Zellen enthalten. Diese

wurden bei der Auswertung ignoriert und gingen nicht in die Zählung ein [Abbildung 3].

2.4 Präzisionskontrolle

2.4.1 SYSMEX

2.4.1.1 Gerät

Der SYSMEX K-1000 (Kobe, Japan) ist ein vollautomatisches Hämatologie-Analysengerät für die quantitative in vitro-Diagnostik in klinischen Laboratorien.

Er garantiert ein schnelles, einfaches und richtiges Screening derjenigen Proben von Patienten, deren abnormale Blutwerte weitere Untersuchungen erforderlich machen. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit wurde regelmäßig überprüft durch Messung interner und externer Standards. Dieses in vielen Multicenterstudien getestete Gerät eignet sich daher besonders als Vergleich für die Richtigkeit der Dapi-Messungen [4, 14, 31]. Der SYSMEX K-1000 kann jedoch Leukozyten nur im (annähernd) physiologischen Bereich zuverlässig detektieren (unterste Grenze: ca. 100 WBC/ μl). Insofern war das System nur zur Analyse von unverdünnten Proben geeignet.

Systemaufbau:

Der SYSMEX K-1000 besteht aus einer Haupteinheit und einer Druck-/ Vakuum-Versorgung.

Die Haupteinheit gliedert sich in hydraulische und elektronische Komponenten.

Durch das hydraulische System wird die entsprechende Probe angesaugt, pipettiert, verdünnt, gemischt und lysiert.

Das elektronische System analysiert und berechnet aus den Messsignalen des hydraulischen Systems die Ergebnisse und übermittelt diese an den integrierten Drucker.

Reagenzien:

Es werden ein Verdünnungsmittel und Lysemittel für jeden Messzyklus und ein Detergenz zur Reinigung benötigt.

Das WBC-Lysemittel (Stromatolyser-3WP) lysiert rote Blutzellen vollständig und zerstört deren Membran so weit, dass sie keinen Einfluss mehr auf die WBC-Messung haben. Pro Zyklus wird 1 ml SYSMEX Stromatolyser-3WP benötigt.

Als Detergenz wird nach jeder Zählung das stark alkalische SYSMEX Cellclean verwendet, welches Lysemittelrückstände, zelluläre Bestandteile sowie Proteinablagerungen im hydraulischen System entfernt.

Probenflusssystem WBC

Alle Schläuche und Kammern werden nach jeder Messung gespült. Kontamination und Verschleppung werden damit auf ein Minimum reduziert.

Das mit EDTA durchmischte Blut wird durch eine Ansaugpipette in das Probendosierventil gesaugt. Aus der angesaugten Probe werden 12 µl entnommen und mit ca. 2 ml Verdünnungsmittel Cellpack und ca. 1 ml Stromatolyser 3-WP direkt in der Messkammer verdünnt. Exakt 0,4 ml der verdünnten Probe (1 : 250) werden aus der Messkammer durch die Messkapillare gesaugt und die Partikel gezählt.

2.4.1.2 Kontrollzählung

Zur Validierung der durchflußzytometrischen Messung der Leukozyten in den Thrombozytenkonzentraten wurde täglich parallel eine Kontrollzählung mit Hilfe des SYSMEX K-1000 durchgeführt (Richtigkeitskontrolle).

Hierzu wurde jeden Tag der Leukozytengehalt einer frischen Vollblutprobe im SYSMEX K-1000 bestimmt.

Dieselbe frische Vollblut-Probe wurde sofort danach mit Hilfe der DAPI-Färbung im Durchflußzytometer gezählt und die Leukozytenanzahl bestimmt.

Jede Vollblutprobe wurde dreifach mit beiden Geräten analysiert.

Die Leukozytenzahlen derselben Vollblutprobe, einmal gemessen im SYSMEX K-1000 und einmal gemessen im Durchflußzytometer können so direkt verglichen werden.

Das Hämatologie–Analysegerät SYSMEX K-1000 ist ein zur Messung von Blutparametern validiertes Gerät. Deshalb können diese Werte als Referenzwerte zur Sicherung und zum Nachweis der Messung des Durchflußzytometers angesehen werden.

2.4.2 Ballast-Zählkammer

2.4.2.1 Gerät

Die Zählkammer ist ein Präzisionsgerät aus optischem Spezialglas. Sie wird verwendet, um Zellen oder andere Teilchen in Suspensionen unter dem Mikroskop zu zählen: Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten sowie Zellen im Liquor

Bauprinzip:

In einer rechteckigen, dicken Grundplatte aus optischem Spezialglas in der Größe eines Objektträgers befinden sich im mittleren Drittel vier Längsnuten, die parallel zu den kurzen Seiten verlaufen. Die beiden größeren Außenflächen sind unbearbeitet und dienen der Beschriftung. Der Mittelsteg und die beiden Außenstege sind plangeschliffen und poliert. Die Oberfläche des Mittelsteges ist gegenüber den beiden Außenstegen vertieft. In den Mittelsteg (Kammerboden) sind die Zählnetze eingraviert.

Wird ein Deckglas auf die Außenstege gelegt, so entsteht zwischen der Unterseite dieses Deckglases und dem Mittelsteg der Zählkammer ein Kapillarspalt.

Bei der Ballastzählkammer ist der Mittelsteg geteilt, so dass zwei Zählnetze à 40 Kästchen entstehen. Dies entspricht einem Probenvolumen von $2 \times 50 \mu\text{l} = 100 \mu\text{l}$.

Das Zählnetz ist mit einer vertikal numerischen und horizontal alphabetischen Netzkennzeichnung ausgestattet, was die Übersicht bei der optischen Zählung verbessert. Die Außenstege werden mit destilliertem Wasser befeuchtet und das Deckglas dann mit sanften Druck von vorn auf die Zählkammer geschoben.

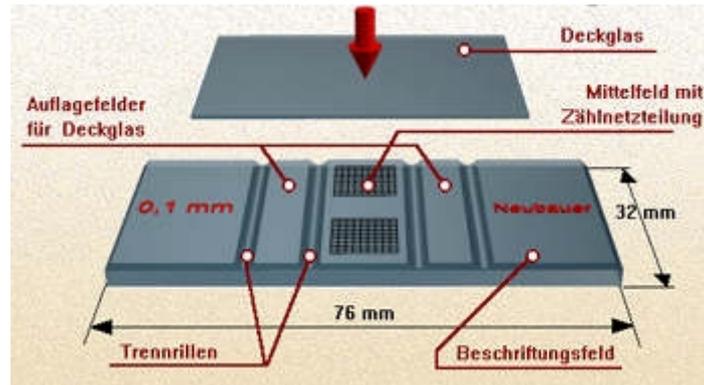


Abbildung 5: Bauprinzip der Ballastzählkammer

Probenbereitung:

Die zu messende Probe sollte zuerst gründlich mit einem Schüttler durchmischt werden. Dann werden 50 µl der Probe mit 450 µl Essigsäure (3 %ig) für 10 min lysiert.

Danach erfolgt die Beschickung der Kammer mit anschließender 10minütiger Sedimentation in der feuchten Kammer.

In einem Phasenkontrastmikroskop bei 100 bis 200-facher Vergrößerung können die Leukozyten gezählt werden.

Diese Methode ist besonders gut geeignet, um Leukozyten in Thrombozytenkonzentraten zu zählen.

Die Anzahl der in der Probe enthaltenen Leukozyten wird nach folgender Formel ausgerechnet:

$$\frac{\text{Gezählte Leukozyten} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Volumen der Kammer}} = \text{Leukozyten} / \mu\text{l}$$

2.4.2.2 Kontrollzählung

Die Ballastzählkammer ist das bis heute übliche und am häufigsten verwendete Verfahren, um leukozytendepletierende Blutkomponenten auf ihren Restleukozytengehalt hin zu überprüfen.

Ziel der Kontrollzählung mit der Ballastzählkammer war es, einzelne erhöhte Messergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung im CyFlow® nochmals zu überprüfen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden insgesamt 14 der 991 Blutproben einer Kontrollzählung unterzogen. Hierbei wurden Konzentrate mit vermutlich hohen Leukozytenzahlen, insgesamt 4 Blutproben, kontrolliert. Darüber hinaus wurde ca. jede hundertste (10 von 991) „unauffällige“ Blutprobe mit niedrigen Leukozytenzahlen herausgegriffen und gezählt

2.4.3 CD45 Messung

2.4.3.1 Gerät

Immunologische Kontrollmessungen

wurden am PAS (Particle Analysing System, Partec, Münster) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein dem CyFlow® ähnliches Durchflußzytometer. Es zeichnet sich durch einen „internen“ blauen Argon-Ionen-Laser der Wellenlänge 488 nm aus. Der Ablauf der eigentlichen Messung wurde bereits in Abschnitt 2.3.2 beschrieben.

2.4.3.2 Kontrollzählung

Ziel der Kontrollzählung mit dem Partec PAS war es, die Messergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung kernhaltiger Zellen (WBCs) im CyFlow® nochmals über eine immunologische Bestimmung dieser Zellen zu verifizieren.

Eine Probe von 100 µl der Thrombozytenkonzentrate wurde mit 10 µl des monoklonalen Antikörpers gegen CD 45 versetzt.

Hierbei handelt es sich um den murinen CD 45 Antikörper (Klon J33 Immunotech, Coulter, Marseille, Frankreich), der mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert ist und alle Leukozyten anfärbt.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden 100 µl Fixierlösung (6%ige Paraformaldehyd-Lösung) hinzugefügt und erneut für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Danach wurde die Lösung mit 2500 µl CyLyse (Erythrozyten-Lyse-Reagenz, Partec, Münster) versetzt und für weitere 20 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Danach erfolgte die durchflußzytometrische Bestimmung der CD 45-positiven Zellen. Mit Hilfe dieser Kontrollzählung wurden insgesamt 13 der 991 Blutproben gemessen. Es wurden 3 Konzentrate mit hohen Leukozytenzahlen kontrolliert und ebenfalls ca. jede hundertste (10 von 991) „unauffällige“ Blutprobe mit niedrigen Leukozytenzahlen herausgegriffen und gezählt

3 Ergebnisse

Die Vorgabe durch das COUNCIL OF EUROPE, Leukozyten in zellulären Blutprodukten auf weniger als 1×10^6 Leukozyten pro Mikroliter abzureichern, erfordert ein sensitives Nachweisverfahren in der Qualitätskontrolle.

Mikroskopische Methoden sind hierbei nur geeignet, um die gesetzlich vorgeschrieben Menge von 1-5% aller Produkte zu untersuchen. Wünschenswert in diesem Zusammenhang wäre aber die Messung aller Proben, was jedoch nur mit automatischen Zählverfahren möglich ist.

Eine im Institut für Strahlenbiologie etablierte Methode zur Quantifizierung kernhaltiger Zellen wurde in dieser Arbeit auf ihre Tauglichkeit zur Qualitätskontrolle getestet.

3.1 Vorversuche

3.1.1 Vollblut in Phosphatpuffer

Zur Validierung der Versuchsmethode bei niedrigen Leukozytenzahlen wurden Verdünnungsreihen pipettiert. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 2,48% bei niedriger Verdünnung und 33,63% bei sehr hoher Verdünnung. Dies entspricht bei der verwendeten Blutprobe einer Sollzahl von 460 Leukozyten/ μl bzw. 0,46 Leukozyten/ μl .

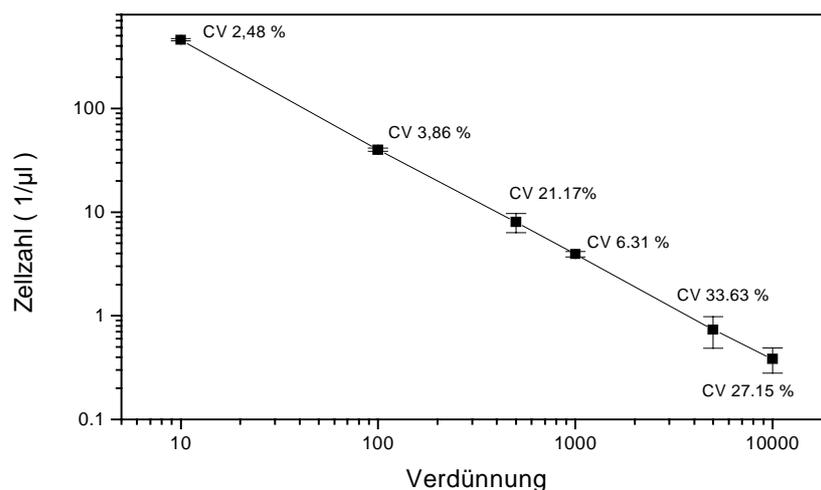


Abbildung 6: Verdünnungsreihe Vollblut in Phosphatpuffer

Jede Verdünnungsstufe wurde dreimal gemessen.

Die Korrelation nach Pearson beträgt 0,993 und ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

3.1.2 Ungefilterte Erythrozytenkonzentrate in gefilterten Erythrozytenkonzentraten

Zur Validierung der Versuchsmethode bei niedrigen Leukozytenzahlen wurden außerdem Verdünnungsreihen mit gefilterten Erythrozytenkonzentraten durchgeführt. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 3,47% bei niedriger Verdünnung und 26,91% bei sehr hoher Verdünnung. Dies entspricht bei der verwendeten Blutprobe einer Sollzahl von 750 Leukozyten/ μl bzw. 0,75 Leukozyten/ μl .

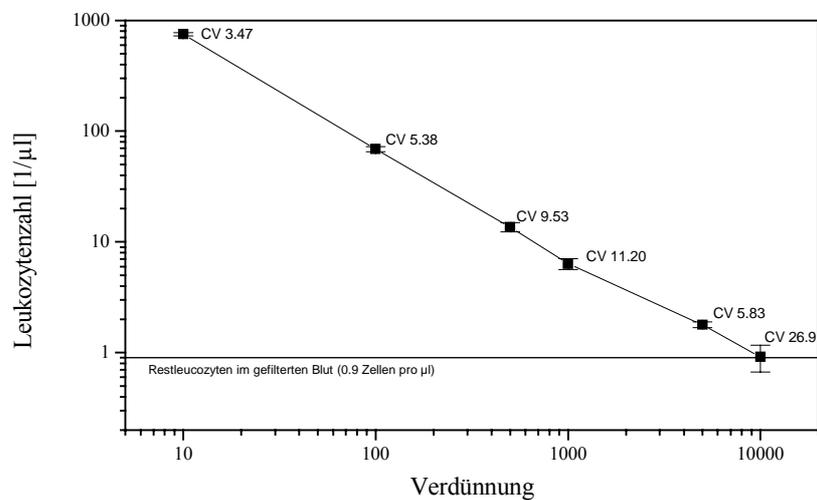


Abbildung 7: Verdünnungsreihe ungefilterte Erythrozytenkonzentrate in gefilterten Erythrozytenkonzentraten.

Jede Verdünnungsstufe wurde dreimal gemessen.

Die Korrelation nach Pearson beträgt 0,997 und ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Die Restleukozyten im gefilterten Blut (0,9 Zellen pro Mikroliter) geben den Leerwert des gefilterten Erythrozytenkonzentrates an. Dabei handelt es sich um Zellen, die auch bei sehr hohen Verdünnungen oder in den unverdünnten gefilterten Erythrozytenkonzentraten nachweisbar sind.

3.2 CyFlow®

3.2.1 Übersicht

Insgesamt wurden 991 leukozytenreduzierte Thrombozytenkonzentrate mit Hilfe der Flowcytometrie untersucht. Dabei galt es, aufgrund unvollständiger Eliminierung im Konzentrat verbleibenden Restleukozyten nachzuweisen und zu quantifizieren

Tabelle 7: Deskriptive Statistik des Messwerte

	Leukozyten pro μl	Leukozyten pro Einheit
Minimum	0,05	0,01
Maximum	200,50	46,14
Median	2,28	0,53
Mittelwert	1,35	0,31
Standardabweichung	7,40	1,73
Varianz	54,79	2,98

Richtwert [46]	4	1×10^6
Anzahl der Proben, die den Richtwert überschreiten	73	59
Prozentualer Anteil der Proben, die den Richtwert überschreiten	7,4	6,0

Aufgelistet sind die Leukozytenwerte in Thrombozytenkonzentraten. Alle oben wiedergegebenen Werte ergeben sich aus 991 gemessenen Blutprodukten, wobei Minimum und Maximum den niedrigsten und höchsten gemessenen Leukozytenwert beschreiben. Es ergibt sich für das Thrombozytenkonzentrat mit dem höchsten WBC – Wert demzufolge eine 46-fache Überschreitung des Grenzwertes.

Die Abweichung der Werte in den Spalten „Leukozyten pro μl “ und „Leukozyten pro Einheit“ ist auf die unterschiedlichen Beutelgewichte, Bruttogewichte und Nettovolumina, die bei der Berechnung der „Leukozytenzahlen pro Einheit“ Eingang finden, zurückzuführen.

Von den insgesamt 991 getesteten Blutprodukten überschritten 59 den Richtwert.

Mit 0,05 Leukozyten/ μl wurde der niedrigste Wert gemessen, während der höchste bei 200,5 Leukozyten/ μl lag. Die Leukozytenkontamination sollte laut COUNCIL OF EUROPE nicht mehr als 4 Leukozyten/ μl betragen.

3.2.2 *Dotplot-Darstellungen*

Messtechnisch lassen sich kernhaltige Zellen unterschiedlich darstellen. Ein in dieser Arbeit angewandtes Verfahren misst die DAPI-Fluoreszenz bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (im blauen Bereich bei 455 nm und im orangen Bereich bei 570 nm). Dies ermöglicht begrenzte Spektren und somit den Vergleich zweier Darstellungen in einem Zwei-Parameter Dotplot. Die Leukozytenzahlen lassen sich über ein Auswertefenster (Gate) bestimmen

Exemplarisch werden die Ergebnisse dreier Proben mit unterschiedlich starker Leukozytenkontamination herausgegriffen.

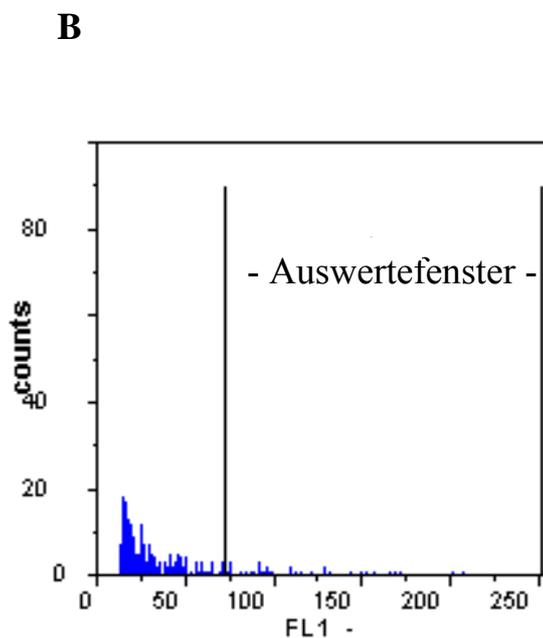
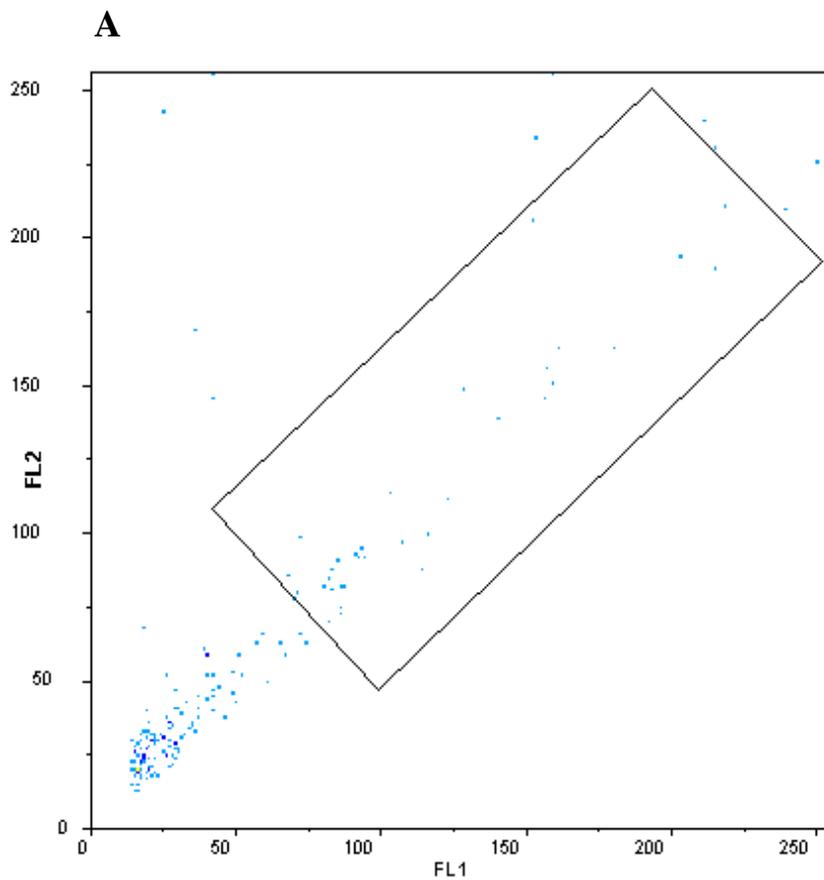


Abbildung 8: Messung eines Thrombozytenkonzentrates mit geringer Leukozytenkontamination ($0,65$ Leukozyten/ μl) in der Dotplot -Darstellung (A) und der Ein-Parameter-Darstellung (B)

Die Zahl der Ereignisse im Auswertefenster bzw. Gate wurde softwaregesteuert errechnet und ausgedruckt.

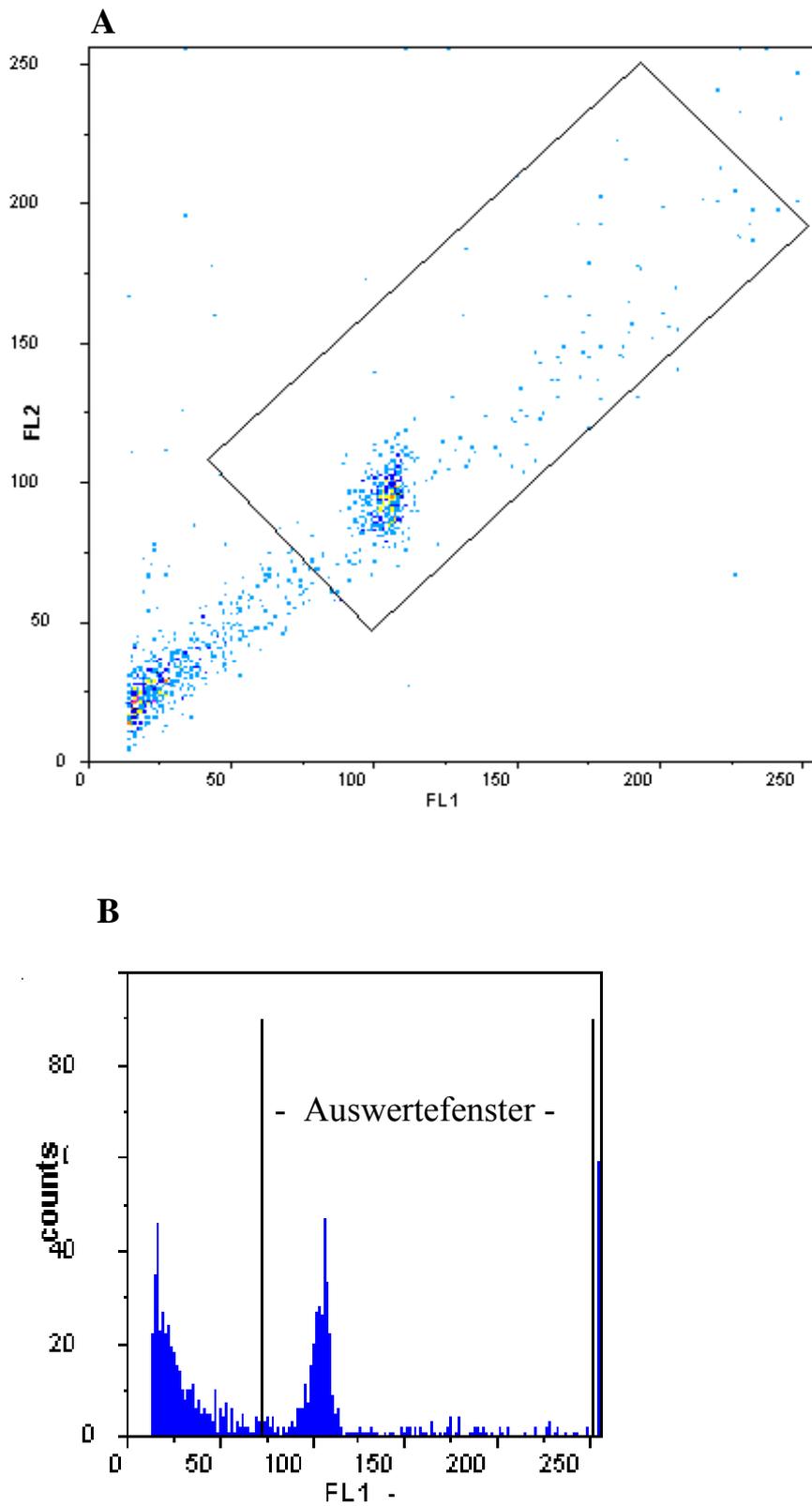


Abbildung 9: Messung eines Thrombozytenkonzentrates mit hoher Leukozytenkontamination (9,55 Leukozyten/ μ l). In der Dotplot - Darstellung (A) ist ein Cluster und in der Ein-Parameter-Darstellung (B) ein Peak für intakte Leukozyten klar abgrenzbar

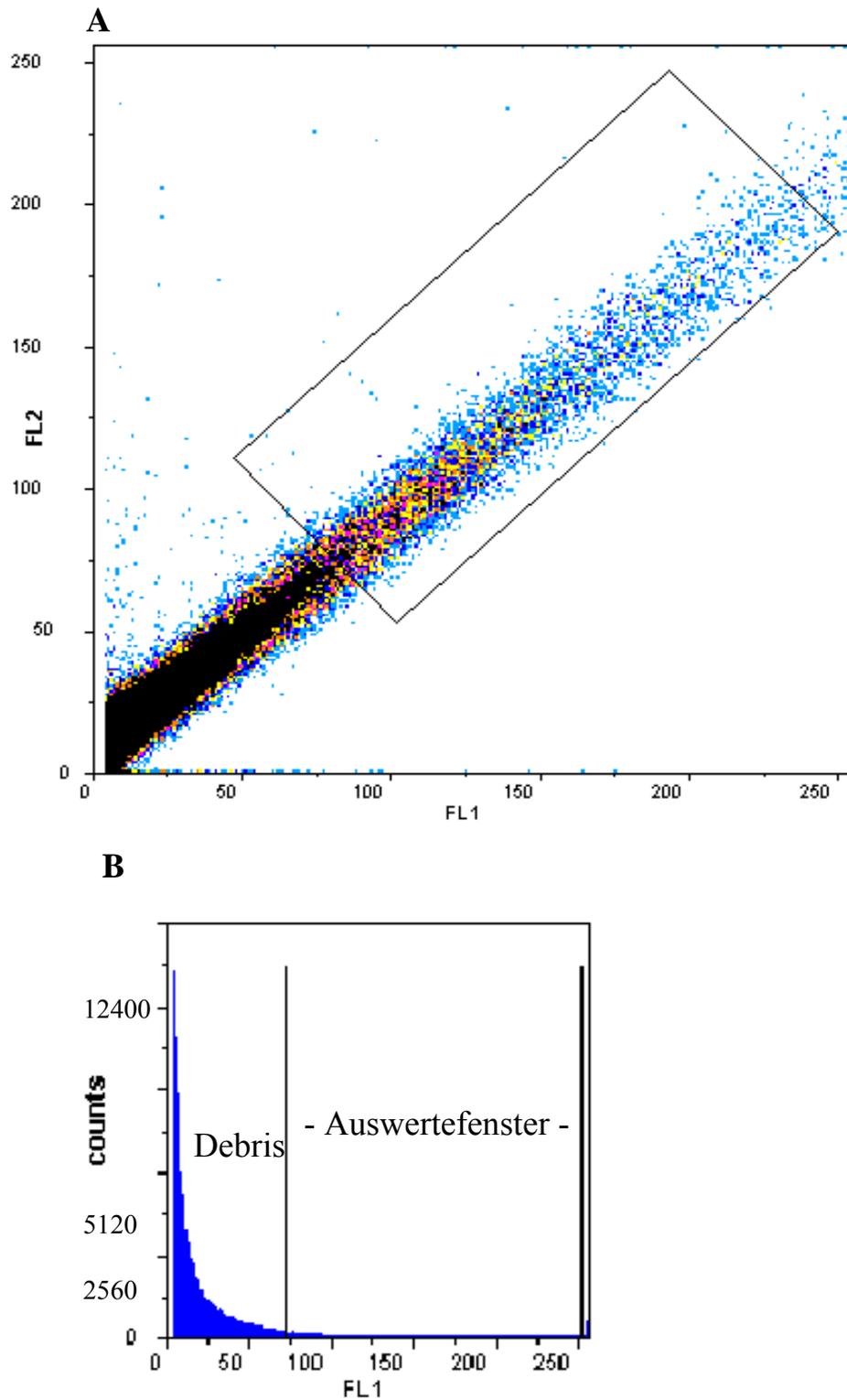


Abbildung 10: Messung eines Thrombozytenkonzentrates mit Debris-Kontamination (162,4 Ereignisse/ μ l)

Ein Cluster (A) oder Peak (B) für intakte Leukozyten ist nicht zu erkennen

Beim Vergleich der Abbildung 9 mit der Abbildung 10 fällt die deutlich unterschiedliche Verteilung der Dots auf.

Während in Abbildung 9 eine relativ scharf abgegrenzte Leukozytenpunktswolke erkennbar ist, fehlt diese in Abbildung 10 gänzlich.

Auch die absolute Anzahl der Dots variiert. Hier sieht man statt eines isolierten Zellclusters ein breites Band an Dots, das sich zu den hohen Kanäle hin verjüngt.

3.2.3 Gegenüberstellung der einzelnen Apherese-Geräte

Die Thrombozytenkonzentrate wurden an 16 unterschiedlichen Zellseparatoren gewonnen. Es galt nun im Rahmen dieser Studie, die einzelnen Leukozytenkontaminationen den entsprechenden Geräten zuzuordnen. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die mittlere Zahl der Leukozyten in Produkten.

Tabelle 8: Deskriptive Statistik der einzelnen Apherese-Gerätetypen
[Leukozyten/Einheit]

Gerätetyp	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung
A1	72	0,04	4,60	0,4967	0,5998
A2	88	0,04	2,93	0,3897	0,4145
A3	51	0,03	46,14	1,7343	6,5880
A4	86	0,05	10,63	0,5469	1,1602
A5	23	0,05	1,17	0,2796	0,2468
A6	63	0,07	8,94	0,7914	1,8088
C1	83	0,01	1,11	0,3294	0,2208
C2	42	0,06	7,25	0,6500	1,3371
C3	38	0,02	1,22	0,3400	0,2795
C4	75	0,02	11,75	0,4745	1,3462
C5	21	0,04	2,66	0,4300	0,5439
C6	24	0,04	1,02	0,3504	0,2463
C7	34	0,07	1,09	0,3715	0,2542
C8	81	0,04	2,34	0,4510	0,4074
T1	112	0,04	1,70	0,4141	0,3140
T2	98	0,05	6,54	0,5251	0,9305

Insgesamt wurden 16 unterschiedliche Geräte getestet.

Es sind jeweils mit N die Zahl der aufgearbeiteten Probe, mit Minimum und Maximum die niedrigsten und höchsten Zählwerte wiedergegeben.

Tabelle 9: Anzahl der Grenzwertüberschreitungen von maximal zulässiger Leukozytenkontaminationen in Thrombozytenkonzentraten, aufgeschlüsselt nach Zellseparatoren

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	T1	T2
Anzahl der Proben, die den Richtwert pro Einheit überschreiten	4	5	8	6	1	5	1	4	2	3	1	1	1	7	5	5
Bestätigung durch Kontrollversuch	0	0	4	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

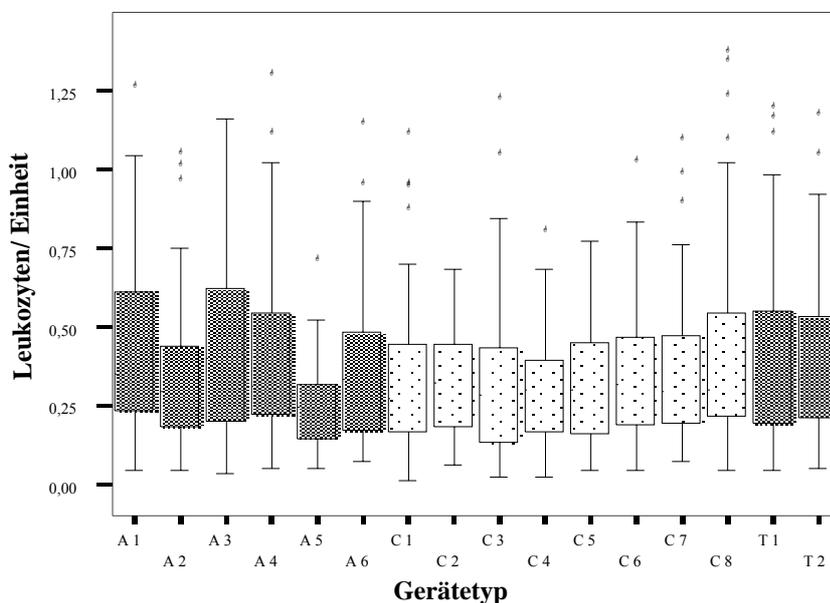


Abbildung 11: Boxplot-Darstellung für die einzelnen Geräteuntertypen [Leukozyten pro Einheit]

Ein Boxplot ist ein zusammenfassender Plot mit der Ausgabe des Medians, der Quantilwerte sowie der Extremwerte. Die Boxplots bestehen aus „Kästen“, die 50% der Werte enthalten. Diese fallen zwischen das 25. und 75. Perzentil.

In Abbildung 11 und 12 sind diese Kästchen unterschiedlich schraffiert. Bei gleicher Schraffierung handelt es sich um den gleichen Gerätetyp.

Linien erstrecken sich vom Kasten zum höchsten (Maximum) und zum niedrigsten (Minimum) Wert. Ausreißer- und Extremwerte werden hierbei ausgeschlossen und separat als Kästchen (Ausreißer) bzw. Sternchen (Extremwerte) dargestellt. Ausreißer sind dabei die Fälle, deren Werte zwischen dem 1,5- und 3-fachen der Boxlänge vom

höchsten oder niedrigsten Wert der Box liegen. Extremwerte übersteigen das 3-fache der Boxlänge.

Auf die Darstellung von Extremwerten wird in dieser Abbildung verzichtet, da eine übersichtliche graphische Darstellung sonst nicht mehr möglich ist.

Im Folgenden wurden zusammenfassend nur die drei Haupttypen der einzelnen Geräte (A, C, T) in Boxplots gegenübergestellt. Dabei wurden die Leukozytenzahlen bezogen auf eine Transfusionseinheit.

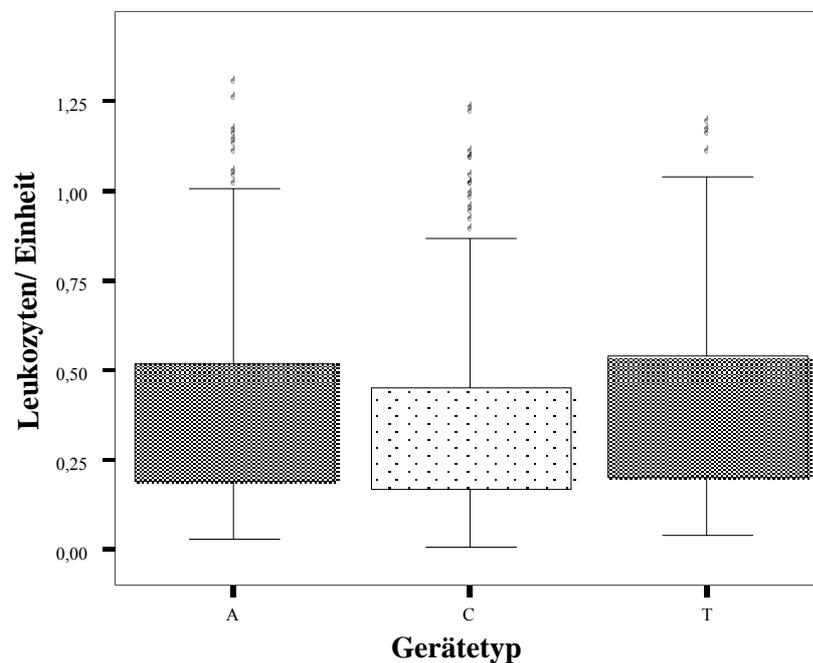


Abbildung 12: Boxplot-Darstellung für die drei Apherese-Gerätetypen [Leukozyten pro Einheit]

3.3 Präzisionsversuche

3.3.1 SYSMEX

Zur Validierung der durchflußzytometrischen Messung der Leukozyten in den Thrombozytenkonzentraten wurde täglich eine Kontrollzählung mit dem SYSMEX K-1000 parallel durchgeführt. Jeweils drei Messergebnisse des CyFlow® wurden drei Messergebnissen des SYSMEX gegenübergestellt.

Die Korrelationen nach Pearson aller Soll- und Ist-Werte ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant und wird in Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 10: Korrelation nach Pearson von CyFlow® und SYSMEX

	CyFlow® 1	CyFlow® 2	CyFlow® 3	SYSMEX 1	SYSMEX 2	SYSMEX 3
CyFlow® 1	1,000	0,936	0,918	0,901	0,848	0,856
CyFlow® 2	0,936	1,000	0,970	0,910	0,879	0,873
CyFlow® 3	0,918	0,970	1,000	0,899	0,870	0,864
SYSMEX 1	0,901	0,910	0,899	1,000	0,996	0,991
SYSMEX 2	0,848	0,879	0,870	0,996	1,000	0,995
SYSMEX 3	0,856	0,873	0,864	0,991	0,995	1,000

Die folgende Abbildung 15 zeigt die lineare Regression mit dem 95,0% Vorhersageintervall für den Einzelwert

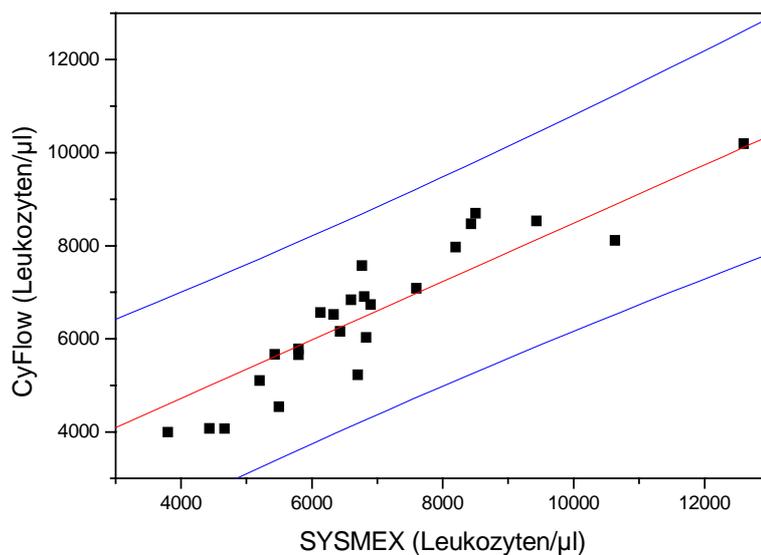


Abbildung 13: Lineare Regression mit 95,0% Vorhersageintervall der Leukozytenzahlen im Vollblut von CyFlow® und SYSMEX

3.3.3 Immunologischer Nachweis von Leukozyten (CD45 Messung)

Bei den DNA –Messungen mit dem CyFlow® wurden 59 Thrombozytenkonzentrate als „kontaminiert“ beurteilt. Ziel war es, zwischen solchen Proben zu unterscheiden, bei denen tatsächlich ein Leukozytenpeak zu finden war, und solchen, bei denen Debris einen erhöhten Leukozytenwert vortäuschte. Zur genaueren Differenzierung solcher Ergebnisse wurden diese Proben mit einem monoklonalen Antikörper gegen das leukozytenspezifische Oberflächenantigen CD45 gefärbt.

Die Abbildung 15 A und B zeigt als Beispiel zwei Histogramme der Analyse. In A wurden mit Hilfe der Quadrantenanalyse im Feld Q1 30,9 Leukozyten gefunden, während in B, eine Probe mit hohen Debriswerten, keine Leukozyten nachgewiesen wurden. Bei den errechneten 0,16 Leukozyten/ μ l handelt es sich lediglich um Hintergrundfluoreszenz und kann damit vernachlässigt werden.

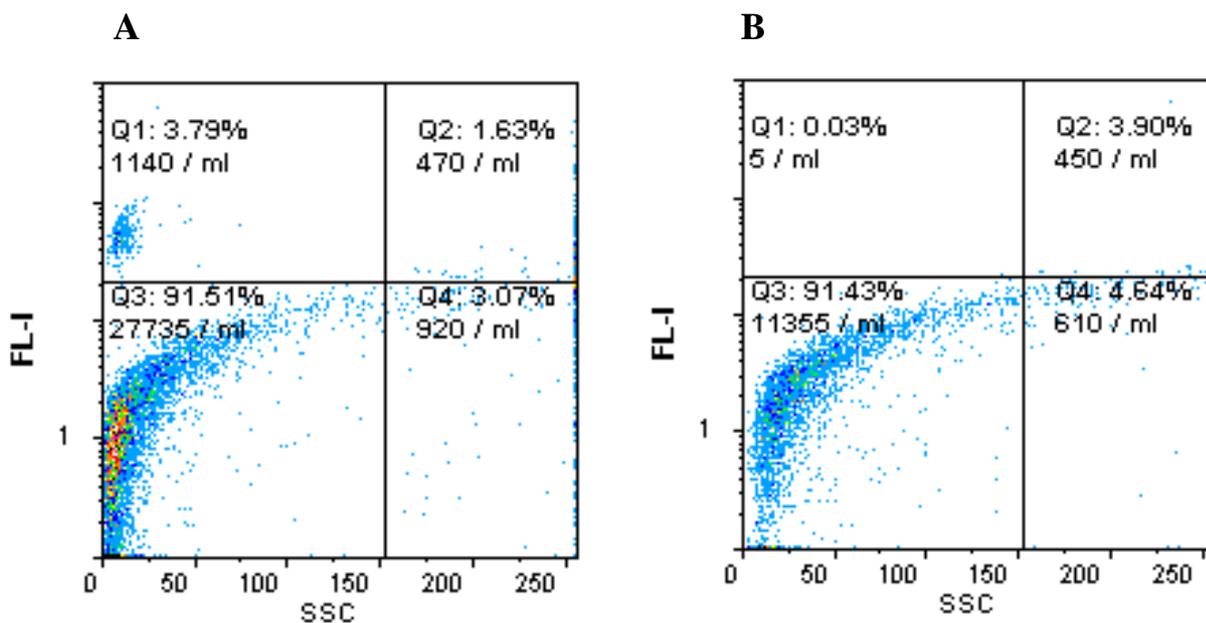


Abbildung 15: Immunologischer Nachweis von Leukozyten in einem Thrombozytenkonzentrat mit einer Leukozytenkontamination von 30,9 Leukozyten/ μ l (A) bzw. von 0,16 Leukozyten/ μ l (B)

Anmerkung:

1140 Zellen / ml x 27,1 (Verdünnungsfaktor) : 1000 = 30,9 Leukozyten / μ l

5 Zellen / ml x 27,1 (Verdünnungsfaktor) : 1000 = 0,16 Leukozyten / μ l

In der folgenden Abbildung wurden die Ergebnisse des CyFlow® denen der CD45-Antikörpermessung gegenübergestellt:

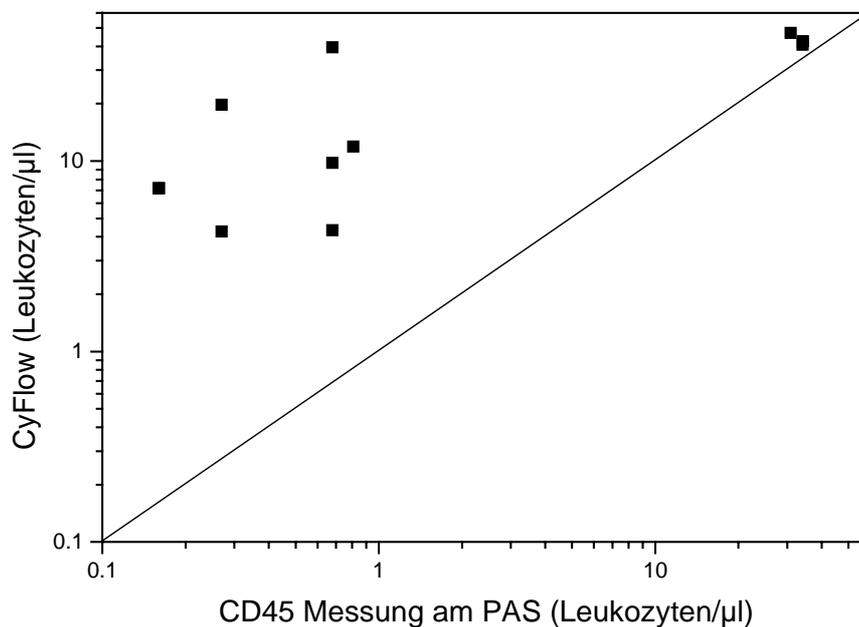


Abbildung 16: Vergleich der immunologischen und der DNA-Nachweismethode

Drei der dreizehn CD45-Messungen stimmen sehr exakt mit der CyFlow®-Messung überein. Diese Werte befinden sich jeweils im Bereich der höheren Leukozytenzahlen (ca. 30 Leukozyten/µl).

Alle übrigen Werte ergaben in der CD45-Antikörpermessung Leukozytenzahlen von unter einem Leukozyten/ µl, bei denen die CyFlow®-Bestimmung Werte zwischen 4 und 40 Leukozyten/µl ergeben. Auch in dieser Abbildung erscheinen zwei Werte nicht, da bei diesen Konzentrationen keine Leukozyten in der CD45-Zählung nachgewiesen werden konnten.

Drei Werte liegen direkt auf der Y-Achse und sind deshalb auf der Abbildung nicht erkennbar. Bei diesen Proben wurden keine Leukozyten in der CD45-Zählung gefunden.

Damit wurde gezeigt, dass es sich nur bei diesen drei Werten tatsächlich um leukozytenkontaminierte Proben handelt, wohingegen die übrigen Werte durch die CD45 Messung nicht bestätigt werden konnten.

Statistische Auswertung

Die Leistungsfähigkeit eines Labortests als diagnostisches Kriterium wird beschrieben durch seine Sensitivität und Spezifität:

Die *Sensitivität* ist ein Maß für die Empfindlichkeit eines Tests. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Blutprobe, die den Richtwert überschreitet, im Test als positiv erkannt wird.

Die *Spezifität* hingegen ist ein Maß für die Eindeutigkeit eines Tests. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine nicht kontaminierte Blutprobe als negativ erkannt wird.

Bei unserer Untersuchung von 991 Proben wurden - wie unter Punkt 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben - 7 Messwerte gesichert als Leukozyten-kontaminierte identifiziert. Diese Blutproben überschritten den Richtwert von 10^6 Leukozyten/ Einheit.

Testergebnis T	Wirklichkeit W		
	Kontamination mit Leukozyten [+]	Keine Kontamination mit Leukozyten [-]	
positiv	7	52	59
negativ	0	932	932
	7	984	991

Sensitivität und Spezifität sind in der Sprache der Statistik nichts anderes als bedingte Wahrscheinlichkeiten:

$$\text{Sensitivität: } P(T = [+]/ W = [+]) = 7/7 = 1$$

$$\text{Spezifität: } P(T = [-]/ W = [-]) = 932/984 = 0,947$$

Es werden 100% der Blutproben, die tatsächlich den Richtwert von 10^6 Leukozyten/ Einheit überschritten, im Test als positiv erkannt (Sensitivität).

Dem gegenüber sind 94,7% der tatsächlich nicht kontaminierten Blutproben im Test negativ (Spezifität).

In der Praxis möchte man aber auch wissen, wie groß bei gegebener Sensitivität und Spezifität die Wahrscheinlichkeit ist, dass eine im Test positive Probe tatsächlich kontaminiert ist, bzw. eine im Test negative Probe tatsächlich nicht kontaminiert ist.

Für diese beiden bedingten Wahrscheinlichkeiten gilt:

$$\text{Positiver prädiktiver Wert: } P(W = [+]/ T = [+]) = 7/ 59 = 0,118$$

$$\text{Negativer prädiktiver Wert: } P(W = [-]/ T = [-]) = 932/ 932 = 1$$

Um zu überprüfen, ob die vom COUNCIL OF EUROPE vorgeschriebene Kontrolle von mindestens 1 % der Proben ausreicht, um alle kontaminierten Proben zu identifizieren, sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Mit welcher Wahrscheinlichkeit findet man bei der vorgeschriebenen Mindestkontrolle von 1 % **alle** fehlerhaften Proben?
2. Mit welcher Wahrscheinlichkeit findet man **zumindest einen** Ausreißer?

Ad 1: Mit welcher Wahrscheinlichkeit findet man bei der vorgeschriebenen Mindestkontrolle von 1 % **alle** fehlerhaften Proben?

Hierbei dient die Binomialverteilung als Modell, da bei dem Versuch zwei Möglichkeiten gegeben sind und diese mit den Wahrscheinlichkeiten p bzw. $1-p$ auftreten. Außerdem liegen n unabhängige Versuche mit der gleichen Einzelwahrscheinlichkeit p vor.

Wie groß ist die Wahrscheinlichkeit „ P “, dass bei „ n “ Stichproben genau „ X “ davon den Richtwert überschreiten? Dieses „ P “ hängt von „ n “, „ X “, und „ p “ ab. Dabei gilt:

$$N = \text{Anzahl der Blutproben} = 991$$

$$n = N * 1\% = \text{Anzahl der Stichproben} \sim 10$$

$$p = \text{Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine beliebige Stichprobe den Richtwert überschreitet}$$

Die Wahrscheinlichkeit p ist streng genommen unbekannt. Aufgrund der hohen Zahl N der untersuchten Blutproben kann man aber ansetzen:

$$p = 7/991 = 0,7064 \% = 0,007064$$

Gemäß der Binomialverteilung errechnet sich P folgendermaßen:

$$P = P(n, x, p) = \binom{n}{x} \cdot p^x \cdot (1 - p)^{n-x}$$

Damit ergibt sich die Wahrscheinlichkeit aus $P(10, 7, 0,007064) = 1,03 \cdot 10^{-13}$.

Somit findet man bei der vorgeschriebenen Mindestkontrolle von 1 % mit einer Wahrscheinlichkeit von $1,03 \cdot 10^{-13}$ alle fehlerhaften Proben.

Diese Wahrscheinlichkeit liegt praktisch bei Null.

Ad 2: Mit welcher Wahrscheinlichkeit findet man zumindest einen Ausreißer?

Die folgende Tabelle verdeutlicht, mit welcher Wahrscheinlichkeiten man in den untersuchten Blutproben welche Anzahl von Ausreißern findet. Hierbei gilt entsprechend wie oben:

p = Erfolgswahrscheinlichkeit für eine einzelne Probe (0,007064)

n = Anzahl der Tests (10)

x = Anzahl der erfolgreichen Tests „Ausreißer“

Tabelle 11: Wahrscheinlichkeiten für die Anzahl der „Ausreißer“

x	P(n,x,p)	1-P(n,x,p)
0	0,931563724	0,068436276
1	0,06627382	
2	0,0021217	
3	4,02515E-05	
4	5,01129E-07	
5	4,27819E-09	
6	2,53635E-11	
7	1,0311E-13	
8	2,75081E-16	
9	4,34888E-19	
10	3,0939E-22	

Das folgende Histogramm zeigt noch einmal deutlich, wie gering die Wahrscheinlichkeiten werden, sobald man mehr als einen kontaminierten Fall mit der vorgeschriebenen Mindestprüfung von 1% aller Blutproben finden will.

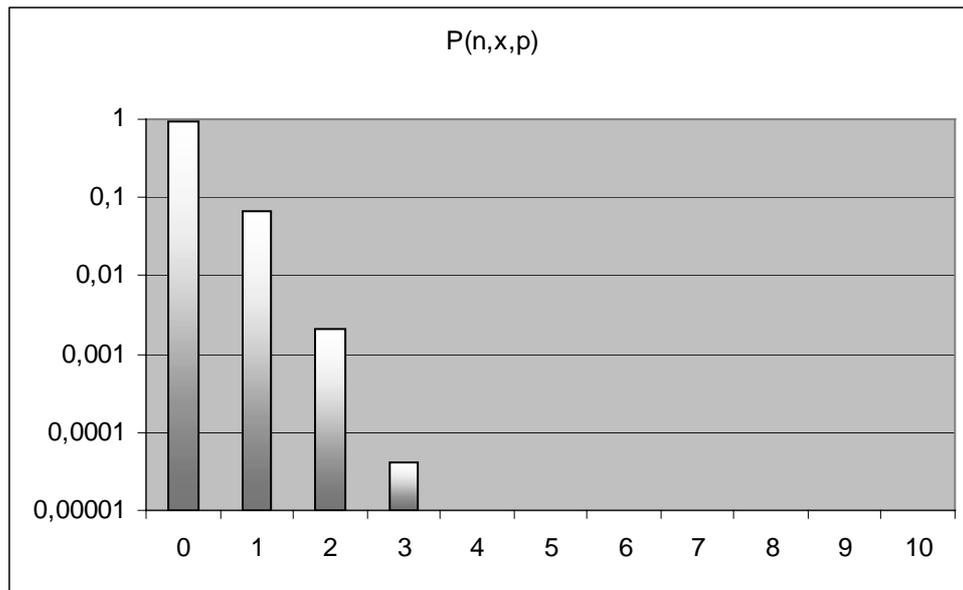


Abbildung 17: Logarithmische Darstellung der Wahrscheinlichkeitsverteilungen

Die Wahrscheinlichkeit, mindestens einen Ausreißer zu finden, liegt bei 6,8 %.

3.4 Zeit und Kostenaufwand

Wie bereits eingangs erwähnt, benötigt man für die mikroskopische Zählung 20-30 min pro Probe. Somit ist diese Methode für die Zählung aller hergestellten Blutprodukte ungeeignet. Im Gegensatz dazu benötigt man für die automatische Zellzählung mit dem CyFlow® 2 min für jede einzelne Probe. Darin eingeschlossen ist bereits die Zeit für die Aufarbeitung und Zählung der Probe.

Neben dem zeitlichen Aufwand entscheidet auch der Kostenfaktor über die Praktikabilität einer automatischen Zählmethode in der Laborroutine.

Die Anschaffungskosten für ein CyFlow® betragen ca. 20.000 €. Die laufenden Kosten setzen sich aus folgendem zusammen:

Alle 300 „Mess-Stunden“ wird eine neue HBO-Lampe erforderlich. Umgerechnet auf eine „Mess-Stunde“ betragen die Kosten ca. 0,3 €.

0,9 ml Dapi sind für jede Probe nötig, die Kosten hierfür belaufen sich auf ca. 0,15 €.

Weitere 0,15 € sind für Probenröhrchen, Messspitzen und ähnliches notwendig.

Die Kosten für jede einzelne Messung liegen somit unter einem Euro, wobei hierbei die einmaligen Anschaffungskosten nicht berücksichtigt wurden.

4 Diskussion

1.1 Bedeutung der quantitativen Leukozytenzählung in Thrombozytenkonzentraten

Das in dieser Studie beschriebene Verfahren der volumetrischen Messung kernhaltiger Zellen mit dem Durchflußzytometer wurde genutzt, um eine zelluläre Kontamination von leukozytenreduzierten Thrombozytenkonzentraten zu bestimmen.

Auf die schweren Komplikationen und langwierigen Folgen einer solchen Kontamination durch Leukozyten wurde in dieser Arbeit bereits ausführlich in der Einleitung eingegangen.

Ziel ist es somit, Nebenwirkungen zu vermeiden oder zumindest so gering wie möglich zu halten.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sogar verhältnismäßig kleine Leukozytenzahlen in Blutprodukten noch negative Auswirkungen auf den Empfänger haben können.

VAN MARWIJK KOOY ET AL. untersuchten den Einfluss der Leukozytenkontamination in Thrombozytenkonzentraten auf die Entstehung von Alloimmunisierung im HLA-System bei leukämiekranken Patienten. Diejenigen, die Thrombozytenkonzentrate mit durchschnittlich 35×10^6 Leukozyten pro 6 Einheiten, entsprechend ca. $5,8 \times 10^6$ Leukozyten pro Einheit, erhielten, entwickelten in 42% der Fälle eine Alloimmunisierung. Bei den Patienten, die Thrombozytenkonzentrate mit durchschnittlich $< 5 \times 10^6$ Leukozyten pro 6 Einheiten, entsprechend weniger als 1×10^6 Leukozyten pro Einheit, erhielten, ergab sich immerhin in 7% der Fälle eine Alloimmunisierung [60].

Den Versuch, eine Art Schwellenwert für das Auftreten von Komplikationen anzugeben, machten zum Beispiel FISCHER ET AL. Ihrer Meinung nach soll eine Alloimmunisierung im HLA-System bereits bei Werten von weniger als 5×10^6 Leukozyten pro Transfusionseinheit möglich sein [15].

So wird deutlich, dass die genaue Quantifizierung von Leukozyten von größter Bedeutung ist. Hochwertige Kontrollgeräte müssen zum Einsatz kommen, um diese notwendige Qualitätssicherung zu gewährleisten.

Die zentrale Frage dieser Arbeit war, ob die durchflußzytometrische Messung kernhaltiger Zellen geeignet ist, den hohen Ansprüchen der Qualitätssicherung gerecht zu werden.

1.2 Validierung der Versuchsmethode

Es wurden in der Literatur verschiedene automatisierte Verfahren zur Messung von Restleukozyten vorgestellt. All diese Techniken benötigen ein Referenzsystem. In dieser Arbeit wurde ein neues, volumetrisches Verfahren zur Absolutzählung geprüft, das in Kombination mit einem einfachen Färbeprotokoll eine kostengünstige Alternative zur manuellen Zählung darstellt.

Das CyFlow, ein auf Volumenmessung basierendes Durchflußzytometer, wurde auf seine Eignung zur Quantifizierung von Restleukozyten in Thrombozytenkonzentraten getestet.

Ein ebenfalls auf Volumenmessung beruhendes Gerät, das CCA (Cell Counter and Analyser), wurde bereits erfolgreich für die Messung von Restleukozyten in Erythrozytenkonzentraten validiert [8].

Wie für das CCA beschrieben, wurden auch für das CyFlow die Linearität, Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Messwerte untersucht. Hierzu wurde Vollblut mit bekannter Leukozytenkonzentration (aus einer SYSMEX-Zählung) zum einen in Phosphatpuffer und zum anderen in doppelt filtrierten Erythrozytenkonzentraten seriell verdünnt.

Die Daten zeigten eine gute Linearität der automatischen Zählmethode bei einer Korrelation nach Pearson von 0,993 für Phosphatpuffer und 0,997 für das Erythrozytenkonzentrat.

Ebenso konnte eine gute Reproduzierbarkeit gezeigt werden mit Variationskoeffizienten von 2,48 % bzw. 3,47 % bei hohen Leukozytenkonzentration von 460/ μ l bzw. 750/ μ l und 27,15% bzw. 26,1% bei niedrigen Leukozytenkonzentrationen von 0,46/ μ l bzw. 0,75/ μ l.

Verdünnungsreihen, die auf einem ähnlichem Prinzip beruhen, sind in der Literatur schon mehrfach erwähnt worden. So beschrieben DZIK ET AL mit 0,1 Leukozyten/ μl eine vergleichbare Sensitivitätsgrenze für die durchflußzytometrische Zählmethode [13].

Auch VACHULA ET AL. [58] gaben einen linearen Zusammenhang zwischen erwartetem und gemessenem Wert bis zu einer Schwelle von 5 Leukozyten/ μl an.

Ähnliche Ergebnisse finden sich sowohl bei LUTZ [26] als auch bei REBULLA ET AL. [43], die zufriedenstellende Ergebnisse bis zu einer Grenze von 0,3 bzw. 0,1 Leukozyten/ μl vorweisen konnten.

Die Richtigkeit der volumetrischen Absolutzählung beruht im Wesentlichen auf der Erfassung eines konstanten Messvolumens. Für das Volumen des CyFlow garantiert der Hersteller einen CV von 2,4%.

1.3 Präzisionsversuche

Der Hämatologiecounter SYSMEX K-1000 (Kobe, Japan) ist, wie in 2.4.1 beschrieben, ein vollautomatisches Hämatologie-Analysegerät. Es dient zur quantitativen in-vitro-Diagnostik in klinischen Laboratorien.

Zur Validierung der durchflußzytometrischen Messung von Leukozyten in den Thrombozytenkonzentraten wurden täglich Kontrollzählungen mit dem SYSMEX K-1000 durchgeführt. Hierzu wurden die Leukozyten einer frischen Vollblutprobe zunächst dreimal mit dem SYSMEX gemessen und parallel dazu mit dem Durchflußzytometer CyFlow®. So war ein direkter Vergleich der Geräte möglich.

Tabelle 10 zeigt die Korrelation nach Pearson für die Messdaten von CyFlow® und SYSMEX.

Der Korrelationskoeffizient für diese beiden Messmethoden lag zwischen 0,848 und 0,91. Die Ergebnisse in Abbildung 13 bestätigen diesen Sachverhalt. Hier sieht man, dass alle korrelierenden Werte innerhalb des Vorhersageintervalls liegen.

Die Schwankungen beim Vergleich der Einzelmessungen lassen sich mit einer nicht ganz optimalen Durchmischung der Blutbestandteile im Blutplasma erklären.

Zusammenfassend kann somit für die Präzisionsversuche festgestellt werden, dass eine gute Reproduzierbarkeit der durchflußzytometrischen Messergebnisse besteht.

Die Referenzwerte des Hämatologiecounters stimmen gut mit den flowzytometrischen Daten überein. Alle volumetrischen Messwerte liegen innerhalb des 95 %-Vorhersageintervalls.

Bei niedrigen Konzentrationen ist die SYSMEX-Messung der durchflußzytometrischen Messung jedoch unterlegen. Der Hämatologiecounter liefert nur bis zu einer Konzentration von minimal 100 Zellen/ μl zuverlässige Messergebnisse. Die durchflußzytometrische Messung kernhaltiger Zellen hingegen kann bis zu 0,1 Leukozyten/ μl exakt zählen.

Deshalb wurden nur Vollblutproben, mit entsprechend hohen Zellzahlen, für den Vergleich von SYSMEX und Durchflußzytometrie verwendet.

Seit Jahren gilt die mikroskopische Zählung von Leukozyten im Blut oder in Blutbestandteilen mit Hilfe der Ballastzählkammer als anerkannte Standardmethode [27,43]. Sie ist neben der Durchflußzytometrie die am häufigsten beschriebene Methode zur Quantifizierung von Leukozyten in leukozytenarmen Blutprodukten.

In dieser Studie wurden die Blutprodukte, die mit volumetrischer Messung erhöhte Leukozytenzahlen aufwiesen, mit der Ballastzählkammer überprüft.

Neben solchen Proben, die eindeutig mit Leukozyten kontaminiert waren, gab es Produkte, die zwar erhöhte Messwerte im Durchflußzytometer zeigten, aber bei denen die Zuordnung der Zählsignale zu den Leukozyten fragwürdig war. Mit Hilfe der Ballastzählkammer konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei ihnen nicht um Leukozyten handelte, sondern um fluoreszierende Partikel oder Zellabbauprodukte.

Die Zuordnung der Leukozyten im 2-Parameter-Dotplot erfolgte über Referenzmessungen mit Vollblutproben. Ein Beispiel für ein korreliertes 2-Parameter-Dotplot ist in Abbildung 4 zu sehen.

Nach dem Gating war in Höhe von Kanal 100 eine Punktwolke zu erkennen. Diese Punktwolke repräsentiert G1- Zellen, also Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden und daher den einfachen Gehalt an DNA im Zellkern besitzen.

Die Höhe der Kanäle korrelierte positiv mit der Menge an DNA. Dementsprechend handelte es sich bei Signalen im Bereich von Kanal 200 um Zellen, die doppelt so viel DNA enthielten wie G1 –Zellen. Diese als G2-Phase-Zellen bezeichneten Ereignisse machten gewöhnlich einen Anteil von weniger als 2 % am Zellzyklus aus. Bei ihnen handelt es sich meistens nicht um Zellen vor der Meiose, sondern um Zellpaare.

Zwischen Kanal 100 und 200 waren die Zellen der S-Phase (Synthese-Phase) zu finden, in der die DNA verdoppelt wird.

Unterhalb von Kanal 85 gemessene Signale repräsentierten Partikel, deren Fluoreszenzintensität kleiner ist als die der normalen Leukozyten. In Einzelfällen konnte der Anteil in Thrombozytenkonzentraten extrem hoch sein. Die Mehrzahl dieser Signale setzte sich aus Zellbruchstücken (Debris) oder anderem fluoreszierenden Material zusammen. Bestätigt wurde dies durch die Untersuchung derselben Probe mit dem Leukozytenmarker CD45 und parallelen Zählungen mit der Ballastzählkammer.

Vereinfacht kann man also sagen, dass alle unbeschädigten Zellen, egal in welcher Phase des Zellzyklus sie sich befanden, in dem Bereich zwischen Kanal 85 und Kanal 250 lagen. Der größte Anteil, nämlich etwa 98%, war in der G1-Phase und somit in Höhe von Kanal 100 zu finden.

Wenn eine Blutprobe in dieser Weise untersucht wurde und sich eine klar abzugrenzende Punktwolke in Höhe von Kanal 100 abzeichnete, konnte man davon ausgehen, dass es sich hierbei um Leukozyten in der G1-Phase des Zellzyklus handelte.

Diese Interpretation war auch auf die Untersuchung leukozytendepletierter Thrombozytenkonzentrate übertragbar. Eine Punktwolke in der Dotplot-Darstellung im Bereich der Leukozyten zeigte, dass es sich um ein leukozytenkontaminiertes Thrombozytenkonzentrat handelte. Die exakte Konzentration wurde durch das Gerät ermittelt.

Der vom COUNCIL OF EUROPE zulässige Grenzwert für leukozytenreduzierte Thrombozytenkonzentrate liegt bei 1×10^6 Leukozyten pro Einheit, entsprechend ca. 4 Leukozyten pro Mikroliter.

Wenn nun der Fall eintrat, dass

1. eine klar abgrenzbare Leukozytenpunkt看ke in Höhe Kanal 100 zu erkennen war und diese
2. den maximalen Höchstwert von 4 Leukozyten pro μl überschritt,

konnte davon ausgegangen werden, eine Probe gefunden zu haben, welche den Grenzwerten des COUNCIL OF EUROPE nicht genügt.

Es fand sich eine klare Beziehung zwischen abgrenzbaren Leukozytenpunkt看ken mit de facto über den Grenzwert erhöhten Leukozytenkonzentrationen einerseits und nicht klar abgrenzbaren Punkt看ken, bei denen sich erhöhte Leukozytenkonzentrationen nicht bestätigten (Beispiele hierfür Abbildung 9 und Abbildung 10)

Bei Proben mit nicht klar abgrenzbaren Punkt看ken konnte man eine Art Kontinuum von fluoreszierenden Ereignissen erkennen, das in Richtung niedriger Kanäle an Häufigkeit zunimmt. Die meisten Ereignisse sind somit in Höhe niedriger Kanäle zu verzeichnen. Diese Verteilung der Ereignisse lässt sich auch eindrucksvoll am entsprechenden Ein-Parameter-Diagramm erkennen. Hier kann man die hohe Anzahl von „Counts“ im Bereich nahe Null und den raschen Abfall an Ereignissen in Richtung höherer Kanäle klar erkennen. Diese bilden die Form einer Hyperbel. Ein Leukozytenpeak ist nicht erkennbar.

Diese Ereignisse bei niedrigen Kanäle stammen, wie oben bereits beschrieben, nicht von „unbeschädigten“ Zellen. Ein solches Produkt dürfte trotz fehlender Leukozytenpunkt看ke medizinisch zumindest sehr problematisch sein. Um eine mögliche Gefährdung des Patienten auszuschließen, sollten diese Proben nicht zur Thrombozytenspende eingesetzt werden.

Mögliche Erklärungen für die Ursache dieser Ereignisse sind:

1. Zelltrümmer, die noch eine geringe Menge an DNA enthalten, welche für die Fluoreszenzsignale verantwortlich ist.
2. aggregierte Thrombozyten,
3. Kontamination bei der Probenbereitung oder -messung

Auch solche Blutproben wurden in der Ballastzählkammer überprüft. So konnte sicher nachgewiesen werden, dass es sich hier nicht um Leukozyten handelt. Eine Unterscheidung zwischen Leukozytenkontamination und Verschmutzung durch Debris ist so möglich.

Bei den Messungen leukozytendepletierter Thrombozytenkonzentrate wurden insgesamt 4 Proben, die in Dotplot-Darstellungen auf eine wirkliche Leukozytenkontamination hinwiesen, in der Ballastkammer geprüft.

Diese doppelt gemessenen Werte (CyFlow® und Ballastzählmessung) zeigten eine hohe Korrelation (Abbildung 14). Der Korrelationskoeffizient betrug 0,998.

Ähnliche Untersuchungen sind in der Literatur zahlreich beschrieben worden:

So konnten LUTZ ET AL. einen Korrelationskoeffizienten von 0,9996 für die Zählergebnisse der Ballastzählkammer und der Durchflußzytometrie angeben. Hier ergab die Zählung in der Ballastzählkammer in einem Zählbereich von weniger als 2 Leukozyten pro Mikroliter allerdings einen Variationskoeffizienten von 40%. MASSE ET AL. konnten einen Korrelationskoeffizienten von 0,974 ermitteln.

Insgesamt wurden 14 von 59 Proben mit auffallend hohen Werten im Durchflußzytometer mit Hilfe der Ballastzählkammer kontrolliert. Der Vergleich der Ergebnisse aus Ballastzählkammer und Durchflußzytometer zeigte jedoch, dass 10 dieser 14 Proben lediglich Verunreinigungen enthielten, die einen erhöhten Leukozytengehalt vortäuschten. Diese 10 Proben waren aufgrund eines nicht abgrenzbaren Leukozytenclusters im Dotplot aufgefallen. Die Verteilung der Messwerte in Form eines Kontinuums ließ auf eine Verunreinigung schließen. Da eine verminderte Qualität durch diese Verunreinigung nicht auszuschließen ist, sollten diese Blutprodukte zunächst keinem Patienten transfundiert werden.

Es ist sicherlich sinnvoll, solche verunreinigten Proben weiteren Untersuchungen zuzuführen.

Abbildung 16 veranschaulicht dieses Ergebnis: 4 der 8 Messwerte korrelieren gut mit der Ballastzählkammer und liegen im Bereich der Diagonalen (die ideale Linie bei identischen Messwerten). Die restlichen Ergebnisse weichen hiervon ab. Bei den übrigen Messwerten konnten keine Leukozyten mit Hilfe der Ballastzählkammer nachgewiesen werden. Diese Werte liegen somit direkt auf der Y-Achse. Dementsprechend sind sie in der Abbildung nicht erkennbar.

Abschließend kann man festhalten, dass die Regressionsanalyse mit Hilfe der Ballastzählkammer die Messergebnisse der Durchflußzytometrie bestätigen konnte. Der hohe Korrelationskoeffizient lässt auf eine sehr gute Linearität und Übereinstimmung des Durchflußzytometers schließen. Somit konnten die Ergebnisse, die die Regressionsanalyse mittels Hämatologiezählgerät ergeben hat, nur bestätigt und wiederholt werden.

Ein Vorteil der durchflußzytometrischen Messung kernhaltiger Zellen gegenüber der Ballastzählkammer liegt sicherlich darin, dass ein größeres Nettoprobenvolumen analysiert werden kann. Dies ist insofern wichtig, da die Größe des Vertrauensintervalls der Ergebnisse sowie die Sensitivität der Messungen vor allem vom prozessierten Probenvolumen abhängt. Eine Arbeit über Fehlerquellen bei der Bestimmung sehr kleiner Leukozytenzahlen konnte dies bestätigen [11].

Die Ballastzählkammer ermöglicht die Auswertung eines Probenvolumens von $2 \times 50 \mu\text{l} = 100 \mu\text{l}$, aufgeteilt in zwei Zählnetze. Bei einer 1:10-Verdünnung der Probe entspricht dies einem Nettoprobenvolumen von $2 \times 5 \mu\text{l}$.

Theoretisch muss mindestens eine Zelle pro $5 \mu\text{l}$ Probe (= 0,5 Zellen pro Mikroliter) vorhanden sein, damit überhaupt ein positives Zählergebnis möglich ist. Dies entspricht der absoluten Nachweisgrenze. Die tatsächliche Nachweisgrenze liegt nach DZIK um den Faktor 10 bis 20 höher, also bei 10 bis 20 Zellen pro $5 \mu\text{l}$ (= 2 bis 4 Zellen pro Mikroliter) [12]. Damit wird gerade noch der Bereich der gewünschten Empfindlichkeit für die Produkte (mit 4 Zellen pro Mikroliter) erreicht.

Andere Autoren gaben Sensitivitätsgrenzen von 0,5 Leukozyten pro Mikroliter an [33].

In der Durchflußzytometrie werden meistens Probenvolumina von $200 \mu\text{l}$ verwendet. Bei einer Verdünnung der Probe von 1:10 entspricht dies einem Nettoprobenvolumen von $20 \mu\text{l}$.

Das in dieser Arbeit benutzte CyFlow[®]-Gerät ermöglicht sogar ein Probenvolumen von $500 \mu\text{l}$, entsprechend einem Nettoprobenvolumen von $50 \mu\text{l}$. Somit wird im CyFlow[®] gegenüber der Kammerzählung ein 10-fach höheres Volumen gemessen. Die Sensitivität, gerade bei geringen Leukozytenkonzentraten, hängt von der Menge an

prozessiertem Volumen ab [11]. Sogar ein Probenvolumen von einem Milliliter ist technisch möglich, erfordert aber mit ca. 4 min eine längere Messdauer.

Auch die durchschnittliche Dauer einer Probenmessung unterscheidet sich erheblich zwischen der Ballastzählkammer und der flowzytometrischen Messung. So wird für eine Zählung in der Ballastkammer im Durchschnitt 10 – 30 Minuten veranschlagt [26, 28, 44]. Mit dem CyFlow® ist es möglich, innerhalb von 30 Minuten 15 Proben zu messen. Die Messung jeder einzelnen Probe dauert somit gerade einmal 2 Minuten. Die Kosten für jede einzelne Zählung betragen weniger als einem Euro. Mit 20.000 € liegt der Anschaffungspreis für ein CyFlow® im Bereich der Kosten für ein einfaches konventionelles Hämatologie-Zählgerät.

Unstrittig ist, dass die mikroskopische Zählmethode einiger Erfahrung bedarf und zudem eine hohe Konzentration von dem Untersucher verlangt. So können Zählfehler durch Müdigkeit und mangelnde Aufmerksamkeit entstehen (hoher intra- und interindividueller Variationskoeffizient). Die hier vorgestellte durchflußzytometrische Technik ist ein vollautomatisches Zählverfahren und damit weitgehend unabhängig von individuellen Einflüssen.

Für die Durchführung der Messung ist keine speziell ausgebildete Fachkraft nötig. Eine kurze Einführung von einigen Stunden im Umgang mit dem Gerät ist ausreichend.

Bei der Verwendung der Ballastzählkammer sind der hohe zeitliche Aufwand und die daraus resultierenden hohen Personalkosten als negative Punkte zu nennen. Das Durchflußzytometer hat dagegen hohe Anschaffungskosten.

Die um den Faktor 10 größere Sensitivität und die Möglichkeit der Automatisierung sprechen für die Durchflußzytometrie. Die Vor- und Nachteile der automatischen Leukozytenzählung sind in einem Übersichtsartikel von DZIK zusammengefasst worden [12].

Der endgültige Nachweis, dass es sich bei den Messwerten auch tatsächlich um Leukozyten handelte, wurde mit Hilfe des Leukozyten-spezifischen CD45-Antigens erreicht.

In Abbildung 15 sind zwei als kontaminiert identifizierte Thrombozytenkonzentrate mit einer Leukozytenkontamination von 30,9 Leukozyten/ μ l (A) bzw. von 0,16 Leukozyten/ μ l (B) zu sehen. In der in Abbildung 17 B gemessenen Probe waren keine CD45-positiven Zellen nachweisbar. Dieses Ergebnis stimmte mit dem der Kammermessung überein. Somit waren die flowzytometrischen Signale eindeutig nicht auf Leukozytenkontamination zurückzuführen.

Insgesamt wurden 13 der 59 Proben, die im CyFlow als kontaminiert erfasst wurden, mittels der CD45 Antikörpermessung kontrolliert. Der Vergleich der Ergebnisse aus CD45-Zählung und Durchflußzytometer zeigte jedoch, dass 10 dieser 13 Proben lediglich Verunreinigungen enthielten, die einen erhöhten Leukozytengehalt vortäuschten. Diese 10 Proben waren aufgrund des fehlenden Leukozytenclusters im Dotplot aufgefallen. Die Verteilung der Messwerte in Form eines Kontinuums ließ auf eine Verunreinigung schließen

In Abbildung 16 sind die 3 Proben mit wirklichen Leukozytenkontaminationen im Bereich hoher Leukozytenwerte (ca. 30 Leukozyten/ μ l) dargestellt. In den niedrigeren Bereichen sieht man vereinzelte Dots ohne linearen Zusammenhang zur Regressionsgeraden. Diese stellen die Debriskontamination dar.

Der Korrelationskoeffizient der Leukozytenkontamination liegt bei $-0,96$. Dieser negative Wert lässt sich folgendermaßen erklären: Alle im CyFlow® gemessenen Leukozytenkontaminationen lagen zwischen 41 und 47 Leukozyten/ μ l. Da die Werte somit in einem sehr engen Intervall liegen, wirken sich kleinste Abweichungen von der Ideallinie sehr viel stärker aus, als bei Proben unterschiedlicher Leukozytenkonzentrationen. Abweichungen der CD45-Messung gegenüber Messergebnissen der Kernfärbung sind durch Lyse erklärbar [3, 9, 18, 22].

Es wurden alle Proben, bei denen sich im CyFlow eine Leukozytenpunkt看ke zeigte, mit einer Präzisionskontrolle gezählt. Dies waren 7 der insgesamt 911 Proben. Von diesen 7 Proben mit grenzwertüberschreitender Leukozytenkontamination wurden 4 mittels Ballastzählkammer, die übrigen 3 mit Hilfe der CD45-Zählung kontrolliert. Bei allen 7 Proben konnte die Leukozytenkontamination so bestätigt werden

Die Sensitivität des Testverfahrens beträgt somit 100%. Alle 7 kontaminierten Proben, die den Richtwert überschritten, wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie als solche erkannt. Allerdings sind nur 94,7 % der tatsächlich nicht kontaminierten Proben im Test auch wirklich als negativ aufgefallen. Somit sind 5,3 % aller Proben zunächst fälschlicherweise im Durchflußzytometer als kontaminiert bewertet worden. Durch bereits detailliert beschriebenen optischen Kriterien konnten diese Proben als mit Debris kontaminiert identifiziert werden.

Mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit kann man aber davon ausgehen, dass eine Probe, bei der die Zählung mit dem CyFlow-Gerät keine Kontamination ergab, auch tatsächlich nicht verunreinigt ist (negativer prädiktiver Wert). Solche Blutproben können somit unbedenklich ohne weitere Testung transfundiert werden.

1.4 Vergleich der Zellseparatoren

Unter 2.2 wurden bereits die Zellseparationssysteme beschrieben.

Im Einzelnen waren dies:

1. der Amicus Zellseparator mit 6 Geräten (A1-A6)
2. das Cobe SpectraTM Apheresesystem mit 8 Geräten (C1-C8) und
3. das TrimaTM Blutkomponenten-Sammelsystem (T1-T2).

Von diesen Geräten wurden, in unterschiedlichen Mengenanteilen, insgesamt 991 leukozytendepletierte Thrombozytenkonzentrate gewonnen. Jedes einzelne Konzentrat wurde mit dem CyFlow[®] auf den Restleukozytengehalt untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7: Deskriptive Statistik des Messwerte aufgeführt. Hier wurde zwischen Leukozyten pro Mikroliter und pro Bluteinheit unterschieden. Der interessantere Wert ist sicherlich die Angabe bezogen auf eine Bluteinheit, weil das COUNCIL OF EUROPE die Richtlinien auch in dieser Maßeinheit angibt.

Bei der Betrachtung der Werte ist zu berücksichtigen, dass hier alle Proben eingingen, auch die, die eindeutig mit Debris belastet waren und weder über CD45 noch über die Ballastzählkammer bestätigt wurden. Die Anzahl der Proben, die den Richtwert von 1×10^6 Leukozyten/ Einheit bei dieser Technik überschritten, lag bei 59 und betrug somit

6%. Durch die Korrelationen mittels Ballastzählkammer und CD45-Messung konnten 7 leukozytenkontaminierte Proben bestätigt werden. Bei den übrigen 52 Proben handelt es sich um Signale, die nicht von Leukozyten stammen.

In unseren Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) [46] eingehalten werden. Demnach dürfen maximal 10% der geprüften Einheiten einen Restleukozytengehalt von 1×10^6 Leukozyten/ Einheit aufweisen.

In Abbildung 11: Boxplot-Darstellung für die einzelnen Geräteuntertypen [Leukozyten pro Einheit] wurden Unterschiede nicht nur zwischen den einzelnen Gerätetypen, sondern auch den Untertypen dargestellt. So fällt zum Beispiel auf, dass das Gerät „A5“ sich mit durchschnittlich niedrigen Leukozytenzahlen positiv abgrenzt. Außerdem scheinen das Cobe Spectra™ Apheresesystem sowie das Trima™ Blutkomponentensammelsystem durchschnittlich geringeren Schwankungen ausgesetzt zu sein, als der Amicus Zellseparator.

Fasst man die Ergebnisse für die einzelnen Geräte der Hersteller zusammen, zeigt das Cobe Spectra™ Apheresesystem die durchschnittlich besten Ergebnisse mit den geringsten Extremwerten.

Auffällig ist weiterhin, dass vier von den sieben mit Leukozyten kontaminierten Proben durch das Gerät A3 (Amicus Zellseparator) hergestellt wurden.

Zwei weitere mit Leukozyten kontaminierte Proben sind von Amicus Zellseparatoren angefertigt worden. Somit stammen sechs der sieben kontaminierten Blutproben von den Amicus Zellseparatoren, obwohl von diesen nur 383 der 991 Blutproben hergestellt worden sind.

Das Cobe Spectra™ Apheresesystem mit 8 verschiedenen Geräten stellte insgesamt 398 der 991 Blutproben her. Hierunter überschritt keine einzige Probe den Richtwert von 1×10^6 Leukozyten/ Einheit.

Das COUNCIL OF EUROPE fordert eine Mindestprüffrequenz von einem Prozent für leukozytendepletierten Thrombozytenkonzentrate [19]. In unseren Untersuchungen wurden unter 991 Thrombozytenkonzentraten sieben Proben gefunden, die den Richtwert von maximal 1×10^6 Leukozyten pro Einheit nicht gerecht wurden. Betrachtet

man nun die statistische Wahrscheinlichkeit, mit der man bei der derzeitigen Mindestprüffrequenz **alle kontaminierten Proben** ausfindig macht, muss man feststellen, dass sie bei $1,03 \times 10^{-13}$, also 0,000000000000103 % liegt. Somit ist es annähernd unmöglich, weder alle Proben noch eine repräsentative Zahl kontaminierter Proben zu finden.

Die Wahrscheinlichkeit, **zumindest einen Ausreißer** zu finden, liegt bei 6,8 %. Aber auch in diesem Fall würden sechs weitere kontaminierte Proben unentdeckt bleiben.

Um das individuelle Risiko für Patienten so weit wie möglich zu reduzieren, ist eine deutlich erhöhte Prüffrequenz, idealerweise von 100%, dringend erforderlich.

Die hier vorgestellte Messtechnik eröffnet diese Möglichkeit bei vergleichbar geringem Kosten- und Personalaufwand.

2 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden klinisch relevante Aspekte der Qualitätssicherung bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten untersucht. Dabei spielte die Zählung von Restleukozyten in den Blutprodukten die zentrale Rolle.

Die vom COUNCIL OF EUROPE festgesetzte PRÜFUNG von mindestens 1 % [19] aller Thrombozytenkonzentrate wird bis heute mit der Ballastzählkammer durchgeführt.

Diese visuelle Methode ist zum einen sehr zeitaufwendig, zum anderen durch subjektive Faktoren wie mangelnde Aufmerksamkeit oder individuelle Erfahrung negativ beeinflusst und kann somit fehlerhafte Ergebnisse liefern. Ein weiterer Kritikpunkt ist die hohe Variabilität einzelner Labore untereinander.

Die vorgeschriebene maximale Leukozytenkontamination von 1×10^6 Leukozyten pro Einheit (entspricht ca. 4 Leukozyten/ μl) steht einer tatsächlichen Nachweisgrenze der Ballastzählkammer von 2 - 4 Zellen/ μl gegenüber [12]. Damit befindet man sich bereits im Grenzbereich der Nachweisbarkeit dieser offiziell verwendeten Kontrollmethode.

Bei unserer durchflußzytometrischen Untersuchung von 991 Thrombozytenkonzentraten fanden sich 59 verdächtige Proben. Bei genauerer Betrachtung der Dotplot-Diagramme und mit Hilfe einzelner CD45-Antikörperkontrollmessungen sowie mit der Ballastzählkammer stellte sich heraus, dass unter den 59 verdächtigen Proben genau sieben durch Leukozyten kontaminierte Thrombozytenkonzentrate waren. Somit konnte bestätigt werden, dass die Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) [46] eingehalten werden.

Bei den übrigen 52 Thrombozytenkonzentraten handelte es sich um Produkte fragwürdiger Qualität, die mit keiner anderen Kontrollmethode auffielen. Bis zur weiteren Abklärung sollten derartige Produkte nicht verwendet werden.

Bei der Gegenüberstellung der einzelnen Apheresesysteme zur Herstellung der Thrombozytenkonzentrate waren das Cobe SpectraTM Apheresesystem sowie das TrimaTM Blutkomponenten-Sammelsystem durchschnittlich geringeren Schwankungen ausgesetzt als der Amicus Zellseparator. Insbesondere der Amicus-Untertyp A3 schien deutlich schlechtere Restleukozytenzahlen zu liefern.

Bei einer Mindestprüffrequenz von 1% ist es rechnerisch und praktisch beinahe unmöglich, auch nur annähernd alle kontaminierten Proben zu entdecken.

Um das Risiko für Komplikationen für jeden einzelnen Patienten zu minimieren, erscheint eine erhöhte Mindestprüffrequenz, am besten die Testung aller Produkte unumgänglich. Die in den vorliegenden Untersuchungen angewandte Messtechnik würde dies bei vertretbarem Zeit- und Kostenaufwand leisten.

3 Literaturverzeichnis

1. Aster, R. H.

International Forum: Which are the parameters to be controlled in platelet concentrates in order that they may be offered to the medical profession as a standardized product with specific properties?

Vox Sang 40, 115-116 (1981)

2. Aye, M. T., Palmer, D. S., Giulivi, A., Hashemi, S.

Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage

Transfusion 35, 117-124 (1995)

3. Bender, J. G., Unverzagt, K., Walker, D.

Guidelines for determination of CD 34+ cells by flow cytometry: application to the harvesting and transplantation of peripheral blood stem cells.

Haematopoietic Stem Cells 31-43 (1994)

4. Berger, C., Steinbach, G., Maier, V.

Sysmex K-1000 Ein Erfahrungsbericht

Labor-Medizin 12, 35-37 (1989)

5. Betriebsverordnung für pharmazeutische Unternehmer

vom 08.03.1985 (BGBl.I Seite 546), zuletzt geändert durch § 35 des TFG vom 01.07.1998 (BGBl.I Seite 1752)

6. Brittingham, T. E., Chaplin, H.

Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets
JAMA 165, 819-825 (1957)

7. Bundesärztekammer

Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten

Deutscher Ärzte Verlag, 2. Auflage (2001)

- 8. Cassens, U., Greve, B., Tapernon, K., Nave, B., Severin, E., Sibrowski, W., Göhde, W.**
A novel true volumetric method for the determination of residual leukocytes in blood components
Vox Sang 82, 198-206 (2002)
- 9. Cassens, U., Gutensohn, K., Garritsen, H., Kelsch, R., Kuehn, P., Sibrowski, W.**
The influence of different erythrocyte lysing procedures on flow cytometric determination of CD34+ cells in umbilical cord blood transplants.
Transfusion Med 8, 111-118 (1998)
- 10. Claas, F. H. J., Smeenk, R. J. T., Schmidt, R., van Steenbrugge, G. J., Eernisse, J. G.**
Alloimmunisation against the MHC antigens after platelet transfusion is due to the contaminating leucocytes in the platelet suspension
Exp Hematol 9, 84-89 (1981)
- 11. Dumont, L. J.**
Sampling errors and the precision associated with counting very low numbers of white cells in blood components
Transfusion 31, 428-432 (1991)
- 12. Dzik, S.**
Principles of counting low numbers of WBC in leukoreduced blood components
Transfus Med Rev 11, 45-55 (1997)
- 13. Dzik, W. H., Ragosta, A., Cusack, W. F.**
Flow-cytometric method for counting very low numbers of leukocytes in platelet products
Vox Sang 59, 153-159 (1990)
- 14. Fares, A. K.**
A study of one thousand cases using the Sysmex K-1000 Haematology Analyser
Sysmex J Int 6, 155-159 (1996)

- 15. Fisher, M., Chapman, J. R., Ting, A., Morris, P. J.,**
Alloimmunization to HLA antigens following transfusion with leukocyte pure and purified platelet suspensions
Vox Sang 49, 331-335 (1985)

- 16. Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln**
Arzneimittelgesetz in der Neufassung durch Bekanntmachung vom 11.12.1998

- 17. Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens**
Transfusionsgesetz vom 01. Juli 1998

- 18. Greve, B., Beller, C., Cassens, U., Sibrowski, W., Severin, E., Göhde, W.**
High grade loss of leukocytes and haematopoietic progenitor cells caused by erythrocyte lysing procedures for flow cytometric analysis
Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research (eingereichtes Manuskript)

- 19. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components.**
7th ed. Strasbourg, France: Council of Europe Publishing (2001)

- 20. Heddle, N. M., Klama, L. N., Griffith, L., Roberts, R., Shulka, G., Kelton, J. G**
A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions
Transfusion 33, 794-797 (1993)

- 21. Hitzer, W.**
Der gegenwärtige Stand der Bluttransfusion – Grundlagen und klinische Bedeutung von Leukozytendepletions- und Mikroaggregatfiltern bei der Bluttransfusion
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 28, 341-351 (1993)

- 22. Kreissig, C., Kirsch, A., Serke, S.**
Characterization and measurement of CD 34 expressing haematopoietic cells
J Hematotherapy 3, 263-290 (1994)

23. Kretschmer, V.

Verschiedene Aspekte des Thrombozytensatzes

In: Maurer, C. (Hrsg.), *Entwicklungen in der Transfusionsmedizin*. Ecomed, Landsberg München Zürich, S. 87-98 (1989)

24. Kubanek, B., Cardoso, M., Glück, D., Koerner, K.

Das Risiko einer Infektionsübertragung durch Blutkomponenten

Infusionsther Transfusionsmed 20, 54-59 (1993)

25. Lane, T., Anderson, K., Goodnough, L.

Leukocyte reduction in blood component therapy

Annals of Internal Medicine 117, 151-162 (1992)

26. Lutz, P., Dzik, W. H.

Large-volume hemocytometer chamber for accurate counting of white cell (WBCs)

in WBC-reduced platelets prepared by apheresis and filtration

Transfusion 33, 409-412 (1993)

27. Masse, M.

Measurement of low numbers of leucocytes: How should it be done?

In: Högman, Claes (Hrsg.), *Leukocyte Depletion of Blood Components*, Amsterdam, VU University Press 1994

28. Masse, M., Andreu, G., Angue, M., Babault, C., Beaujean, F., Bidet, M. L.,

Boudart, D., Carlot, J. P., Cotte, C., Follea, G., Gerata, J., Hau, F., Hurel, C.,

**Legrand, E., Marchesseau, B., Nadr, O., Rober, F., Royer, D.,
Schooneman, F., Tardivel, R., Vidal, M.**

A multicenter study on the efficiency of white cell reduction
by filtration of red cells *Transfusion* 31, 792-797 (1991)

29. Masse, M., Naegelen, C., Pellegrini, N., Segier, J. M., Marpaux, N., Beaujean, F.

Validation of a simple method to count very low white cell concentrations in
filtered red cells or platelets

Transfusion 32, 565-571 (1992)

30. Mazon, M.C.

Leukocyte depletion and infection by cytomegalovirus
Transfus Clin Biol 31, 31-35 (2000)

31. Miama, Y., Akagi, M. Yoneyama, H.

An evaluation report of automated haematology analyser K-1000
Sysmex Journal 11, 122-129 (1988)

32. Miller, J. P., Mintz, P. D.

The use of leukocyte-reduced blood components
Hematol Oncol Clin North Am 9, 69-90 (1995)

33. Moroff, G., Eich, J., Dabay, M.

Validation of use of the Nageotte hemocytometer to count low levels of white cells
in white cells-reduced platelet components
Transfusion 34, 35-38 (1994)

34. Mueller-Eckhardt, C.

Transfusionsmedizin
Springer, Berlin Heidelberg New York (1996)

35. Murphy, M. F., Metcalfe, P., Thomas, H., Eve, J., Ord, J., Lister, T. A., Waters, A. H.

Use of leukocyte-poor blood components and HLA-matched platelets donors to
prevent HLA-alloimmunozation
Brit J Haematol 62, 529-534 (1986)

36. Murphy, S.

Platelet storage for transfusion
Seminars in haematology 3, 165-177 (1985)

37. Murphy, S., Sayar, S. N., Gartner F. H.

Storage at platelet concentrates at 22° C
Blood 35, 549-557 (1970)

- 38. Muylle, L., Joos, M., Wouters, E., De Bock, R., Peetersmans, M. E.**
Increase tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF- α and IL-6 levels and febrile transfusion reactions
Transfusion 33, 195-199 (1993)
- 39. Muylle, L., Wouters, E., De Bock, R., Peetersmans, M. E.**
Reactions to platelet transfusion : the effect of the storage time of concentrate
Transfus Med 2, 289-293 (1992)
- 40. Neumüller, J., Schwartz, D. W. M., Mayr, W. R.**
Demonstration by flow cytometry of the numbers of residual white blood cells and platelets in filtered red blood cell concentrates and preparations
Vox Sang 73, 220-229 (1997)
- 41. Prince, A. M., Smuzness, W., Millian, S. J.**
A serological study of CMV infections associated with blood transfusions
N Engl J Med 284, 1125-1131 (1971)
- 42. Public Health Service Inter-Agency Guidelines Screening Donors of Blood, Plasma, Organs, Tissues and Semen for Evidence of Hepatitis B and Hepatitis C**
Morbidity and Mortality Weekly Report 40 (1991)
- 43. Rebullà, P., Dzik, W. H.**
Multicenter evaluation of methods for counting residual white cells in leukocyte depleted red blood cells
Vox Sang 66, 25-32 (1994)
- 44. Rebullà, P., Porretti, L., Bertolini, F., Marangoni, F., Prati, D., Smacchia, C. Pappalettera, M., Parravicini, A., Sirchia, G.**
White cell reduce red cells prepared by filtration. A critical evaluation of current filters and methods for counting residual white cells
Transfusion 33, 128-133 (1993)

- 45. Renz-Polster, H., Braun, J.**
Basislehrbuch Innere Medizin
Urban und Fischer, München, Jena (2001)
- 46. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)**
Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 43, 555-589
(2000)
- 47. Robert Koch-Institut**
Epidemiologisches Bulletin: HIV-Infektionen und AIDS-Erkrankungen in
Deutschland
Sonderausgabe B, 9..August 2002
- 48. Saarinen, U. M., Kekomäki, R., Siimes, M. A., Myllylä, G.**
Effective prophylaxis against platelet refractoriness in multitransfused patients by
use of leucocyte-free blood components
Blood 75, 512-517 (1990)
- 49. Schneider, W., Schorer, R.**
Klinische Transfusionsmedizin, Edition Medizin, Weinheim (1982)
- 50. Seghatchian, M. J., Wadhwa, M., Thorpe, R.**
Cytokines in platelet concentrates: a comparison of apheresis platelet (haemonetics)
and filtered and unfiltered pooled buffy-coat derived platelet concentrates
Transfus Sci 15 (1), 103-107 (1997)
- 51. Sibrowski, W.**
Infektionen durch Bluttransfusion
Infusionsther Transfusionsmed 21 (1), 4-5 (1994)
- 52. Sibrowski, W., Penner, M., Kühnl, P.**
Transfusionsbedingte Virusinfektion: Wie groß ist das Restrisiko?
Infusionsther Transfusionsmed 20 (2), 4-9 (1993)

53. Slichter, S. J., Harker, L. A.

Preparation and storage of platelet concentrates. I. Factors influencing the harvest of viable platelets from whole blood. II. Storage of viables influencing platelet viability and function

Brit J Haematol 34, 395-419 (1976)

54. Sniecinski, I. O'Donnel, M.

Preventing refractoriness to random donor platelet transfusion

Transfusion 26, 582 (1986)

55. Stangel, W.

Gewinnung, Konservierung und Lagerung von Transfusionsblut

In: Müller-Eckhardt, C. (Hrsg.), Transfusionsmedizin

Springer Berlin Heidelberg New York, 204-229 (1988)

56. Swank, R. L.

Alteration of blood on storage

New Engl J Med 265, 728 (1961)

57. The Trail to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group

Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions.

N Engl J Med 337 (26), 1861-1869 (1997)

58. Vachula, M., Simpson, S. J., Martinson, J. A., Oano, F. M., Hutchcraft, A. M. Balma, D. L., Van Epps, D. E.

Flow cytometric method for counting very low levels of white cells in blood and blood components

Transfusion 33, 262-267 (1993)

59. Valet, G.

A new method for fast blood cell counting and partial differentiation by flow cytometry

Blut 49, 83-90 (1984)

60. Van Marwijk Kooy, M., Van Prooijem, H. C., Moes, M., Bosma-Stants, I., Akkerman, J. W. N.

Use of leukocyte-depleted platelet concentrates for the prevention of refractoriness and primary HLA alloimmunisation: a prospective, randomised trial
Blood 77, 201-205 (1991)

61. Villas, B.H.

Flow Cytometry: An Overview
Cell Vision 5 (1), 56-61 (1998)

4 Lebenslauf

Name	Sonia Bortolussi
Geburtsdatum	24. August 1976
Geburtsort	Münster
Eltern	Toselli Bortolussi, Kaufmann Renate Bortolussi (geb. Dahlmann), Lehrerin
Geschwister	Dr. Bianca Bortolussi, Zahnärztin
Familienstand	ledig

Schulbildung

1983 bis 1987	Peter-Wust-Grundschule, <i>Münster</i>
1987 bis 1996	Annette von Droste Hülshoff Gymnasium, <i>Münster</i>
30.05.1996	Abitur

Studium

1997 bis 2003	Studium der Humanmedizin an der Universität Münster
06.04.1999	Ärztliche Vorprüfung
13.04.2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.04.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
17.06.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
22.01.2004	Approbation

5 Danksagung

Herrn Professor Dr. Göhde danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die sehr gute Betreuung und unermüdliche Diskussionsbereitschaft bedanke ich mich herzlich bei Dr. Burkhard Greve.

Der Landwirtschaftlich-Technischen Assistentin Petra Berkes und der Biologisch-Technischen Assistentin Gerlind Bellmann gilt mein ausdrücklicher Dank.

Bei Dr. E. Severin bedanke für mich für die Durchsicht meiner Arbeit.

Bei Dr. U. Cassens bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung der Blutproben und die sachkundige Hilfestellung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mit Ihrer tatkräftigen Unterstützung den erfolgreichen Abschluss meines Studiums und dieser Arbeit erst ermöglichten.

6 Anhang

6.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Messprinzip der Fließküvette	27
Abbildung 2: CyFlow® der Firma Partec, Münster, Deutschland	28
Abbildung 3: Beispiel für ein 1-Parameter-Histogramm	29
Abbildung 4: Beispiel für ein korreliertes 2-Parameter Dotplot nach dem Gating	30
Abbildung 5: Bauprinzip der Ballastzählkammer	35
Abbildung 6: Verdünnungsreihe Vollblut in Phosphatpuffer	38
Abbildung 7: Verdünnungsreihe ungefilterte Erythrozytenkonzentrate in gefilterten Erythrozytenkonzentraten	39
Abbildung 8: Messung eines Thrombozytenkonzentrates mit geringer Leukozytenkontamination (0,65 Leukozyten/μl) in der Dotplot -Darstellung (A) und der Ein-Parameter-Darstellung (B)	42
Abbildung 9: Messung eines Thrombozytenkonzentrates mit hoher Leukozytenkontamination (9,55 Leukozyten/μl). In der Dotplot -Darstellung (A) ist ein Cluster und in der Ein-Parameter-Darstellung (B) ein Peak für intakte Leukozyten klar abgrenzbar	43
Abbildung 10: Messung eines Thrombozytenkonzentrates mit Debris-Kontamination (162,4 Ereignisse/μl)	44
Abbildung 11: Boxplot-Darstellung für die einzelnen Geräteuntertypen [Leukozyten pro Einheit]	46
Abbildung 12: Boxplot-Darstellung für die drei Apherese-Gerätetypen [Leukozyten pro Einheit]	47
Abbildung 13: Lineare Regression mit 95,0% Vorhersageintervall der Leukozytenzahlen im Vollblut von CyFlow® und SYSMEX	48
Abbildung 14: Vergleich der durchflußzytometrischen Zählung mit der Ballastzählkammer	49
Abbildung 15: Immunologischer Nachweis von Leukozyten in einem Thrombozytenkonzentrat mit einer Leukozytenkontamination von 30,9 Leukozyten/μl (A) bzw. von 0,16 Leukozyten/μl (B)	50
Abbildung 16: Vergleich der immunologischen und der DNA-Nachweismethode	51
Abbildung 17: Logarithmische Darstellung der Wahrscheinlichkeitsverteilungen	55

6.2 *Tabellenverzeichnis*

Tabelle 1: Schätzung von Restrisiko/ Infektiosität transfusionsassoziierter Virusinfektionen im Jahr 1991 [52]	7
Tabelle 2: Qualitätskontrollen bei Einzelspender-Thrombozytenkonzentraten	15
Tabelle 3: Qualitätskontrollen bei leukozytendepletierten Pool-Thrombozytenkonzentraten	15
Tabelle 4: Qualitätskontrollen bei Apherese-Thrombozytenkonzentraten	16
Tabelle 5: Qualitätskontrollen bei Leukozytendepletierten Apherese-Thrombozytenkonzentraten	16

Tabelle 6: Vergleich der Sensitivitätsgrenzen gebräuchlicher Bestimmungsmethoden der Leukozytenzahl in Blutprodukten [27]	17
Tabelle 7: Deskriptive Statistik des Messwerte	40
Tabelle 8: Deskriptive Statistik der einzelnen Apherese-Gerätetypen [Leukozyten/Einheit]	45
Tabelle 9: Anzahl der Grenzwertüberschreitungen von maximal zulässiger Leukozytenkontaminationen in Thrombozytenkonzentraten, aufgeschlüsselt nach Zellseparatoren	46
Tabelle 10: Korrelation nach Pearson von CyFlow® und SYSMEX	48
Tabelle 11: Wahrscheinlichkeiten für die Anzahl der „Ausreißer“	54