

**Risikoeinschätzung einer transfusionsbedingten bakteriellen Infektion
von *Yersinia enterocolitica* aufgrund von Experimenten zur
in vitro Kontamination von Blut und unter Einbezug von Daten aus
Epidemiologie und Hämovigilanz**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktorgrades (Dr. oec. troph.) am

Fachbereich Agrarwissenschaften,

Ökotoxikologie und Umweltmanagement

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Ute Sicker

aus Frankfurt am Main

Im Dezember 2016

Die vorliegende Arbeit wurde am Paul-Ehrlich-Institut, Langen unter der Leitung von Prof. Dr. Sylvia Schnell angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Sylvia Schnell
Institut für Angewandte Mikrobiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Katja Becker
Institut für Ernährungswissenschaft
Justus-Liebig-Universität Gießen

PERSÖNLICHE ERKLÄRUNG

„Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die in der Dissertation angegeben wurden. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ute Sicker

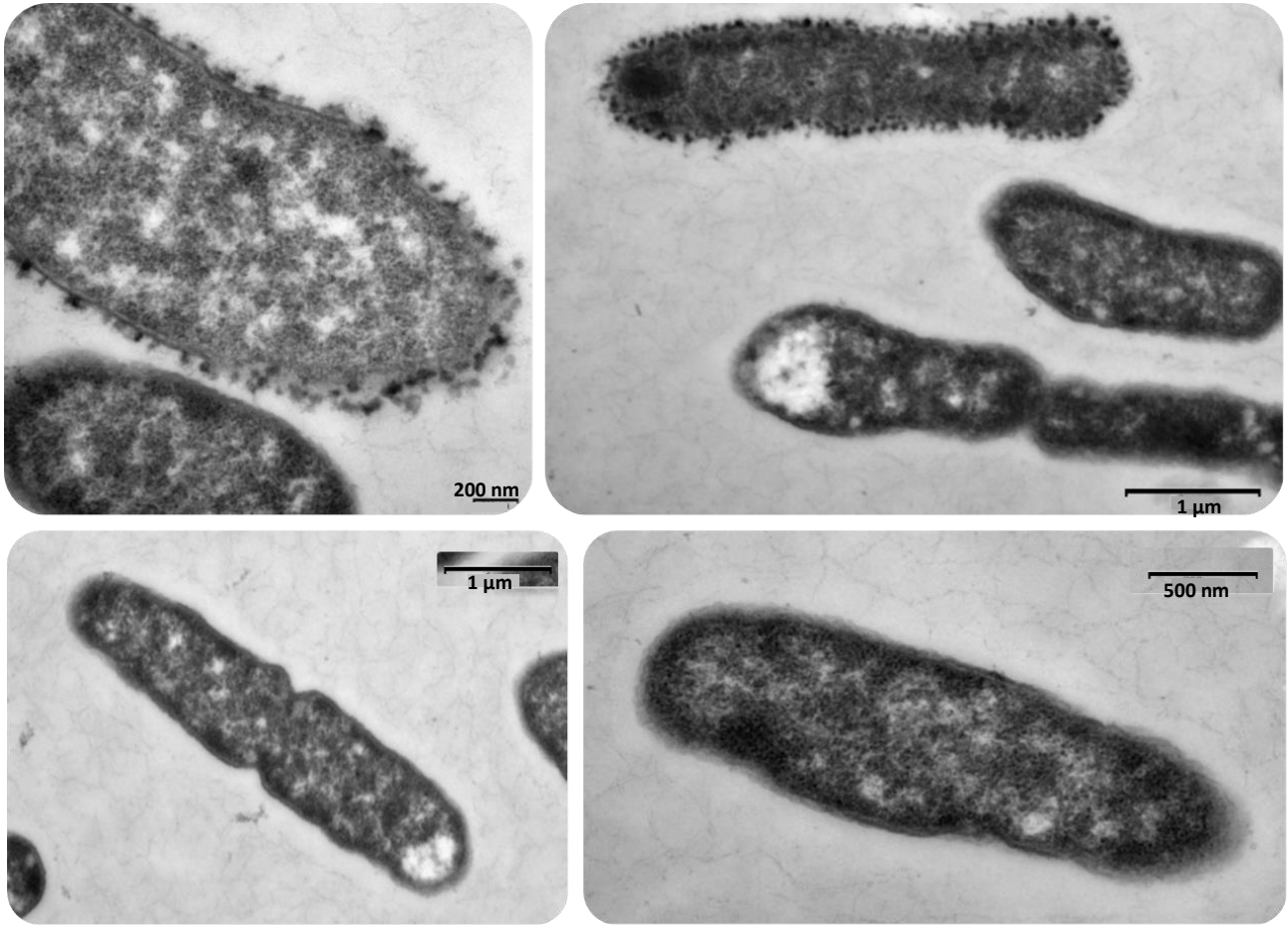


Abbildung: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Yersinia enterocolitica*
PEI-A-101-02 (Aufnahmen: BOLLER, EBERLE, Paul-Ehrlich-Institut, 2015)

Meinen Eltern und meiner Familie

DANKSAGUNG

Mein erster und größter Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell, die nach dem Tod meines Betreuers Dr. Thomas Montag in die Presche gesprungen ist und die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat. Auch Frau Prof. Dr. Katja Becker danke ich für die schnelle und unproblematische Übernahme der Funktion als Zweitgutachter.

Herrn Dr. Thomas Montag danke ich für die Geduld und Unterstützung meiner lang angelegten Promotion, auch wenn ihn dieser Dank nicht mehr erreicht. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Thomas Müller bedanken, der sich immer für die erfolgreiche Beendigung meiner Doktorarbeit stark gemacht hat, der mir die Durchführung meiner Versuche im DRK BSD Springe in der Abteilung Forschung & Entwicklung ermöglichte und bei jeder sich bietenden Gelegenheit ein motivierendes Wort für mich bereit hielt. Auch möchte ich Prof. Dr. Seltsam dankend erwähnen, der mir das Arbeiten in seiner Abteilung F&E ermöglichte. Intensiv unterstützt in Theorie und Praxis des Blutspende ABCs haben mich Frau Dr. Ute Gravemann, Frau Dr. Jessica Rach, Frau Dr. Petra Pohler, Frau Dr. Wiebke Handke, Herr Dr. Bernd Lambrecht und das technische Personal, teilweise bis tief in die Nacht. Vielen, vielen Dank dafür! Und zu danken habe ich auch Frau Dr. Bayer, die mich in Gera während meines ersten Vollblutexperimentes unter ihre Fittiche genommen hat.

Ein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Isabelle Bekeredjian-Ding, die mir den Rücken frei gehalten hat, damit ich meine Doktorarbeit im Paul-Ehrlich-Institut beenden konnte.

Meine Kollegen Oliver Karo, Dr. Utta Schurig, Dr. Eva Spindler-Raffel und Dr. Ingo Spreitzer haben mich mental und beratend unterstützt. Die beiden genannten Damen danke ich noch zusätzlich für intensives Korrekturlesen trotz und während der Sommerferien. Dem technischen Personal Björn Becker, Rekia Beshir, Julia Brachert und Anja Schneider spreche ich meinen Dank für die teilweise sehr spontane Unterstützung aus, die ich ab und an gerne in Anspruch genommen habe.

Im Institut für angewandte Mikrobiologie habe ich die Realtime-PCR Methode kennengelernt. Bellinda Schneider und Dr. Stefan Ratering haben hierfür ihre kostbare Zeit geopfert – einen sehr großen Dank ihnen beiden!

Aber nicht nur meine Kollegen, auch meine Familie haben mich während der langen Zeit unterstützt. Und deshalb danke ich meinen Eltern für die Basis und den Hintergrund, den sie geschaffen haben. Auch den Großeltern meiner Kinder, die unzählige Stunden mit meinen Söhnen verbracht (und vielleicht auch mehr

graue Haare als nötig) haben, um meine Promotion weiter führen zu können. Und meiner Familie, Frank, Ole und Matti für die Dauerbrenner-Frage „Wann bist Du endlich Doktor?“

Meinen Lauffreundinnen gilt auch ein besonderer Dank, da ich sie mit meinen wissenschaftlichen Erzählungen vielleicht das ein oder andere Mal beim Joggen gelangweilt habe, sie sich aber nichts haben anmerken lassen.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Last but not least möchte ich meinem Mann Frank Sicker danken für Geduld und Rückhalt, die mir während der vielen Jahre den Rücken gestärkt haben und den ich regelmäßig mit meinen Fragestellungen überfordert habe.

Warum ich das so lange ausgehalten und durchgezogen habe? Das liegt sicher mit an der Tatsache, dass ich die Menschen, die mich immer unterstützt haben, nicht enttäuschen wollte, mich selber nie über eine abgebrochene Promotionsarbeit ärgern wollte. Und es den Onkeln meines Mannes zeigen wollte, die mich immer so ein bisschen ungläubig und frotzelnd gefragt haben, wie weit ich denn nun *endlich* wäre....

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ail-	Attachment Invasion Locus	PAGGS-M	Phosphat, Adenin, Glukose, Guan- nosin, Saline, Mannitol
AMG	Arzneimittelgesetz	PAMP	Pathogen associated molecular pat- terns
API	Analytischer-Profil-Index	PEI	Paul-Ehrlich-Institut
BC	Buffy Coat	pYV	plasmid for <i>Yersinia</i> virulence
bp	Basenpaar(e)	RNA	Ribonukleinsäure
[Ca ²⁺]	Kalzium-Konzentration	SAG-M	Saline, Adenin, Glucose, Mannitol
CaCl ₂	Kalziumchlorid	TAE	TRIS Acetat EDTA-Na ₂
Caso	Casein-Sojamehl-Pepton	TBBI	Transfusionsbedingte bakterielle In- fektionen
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose	TFG	Transfusionsgesetz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TK	Thrombozytenkonzentrat
EK	Erythrozytenkonzentrat	TKf	Thrombozytenkonzentrat, leukozy- tendepletiert
EKf	Erythrozytenkonzentrat, leukozy- tendepletiert	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
GFP	Gefrorenes Frischplasma	TSB	Tryptic Soy Broth
HLA	Human Leukocyte Antigen	TSCD	Terumo Sterile Connecting Device
IgA	Immunglobulin der Klasse A	TTSS	Type three secretion system
IgG	Immunglobulin der Klasse G	virF	Virulence regulon transcriptional activator
IgM	Immunglobulin der Klasse M	YadA	<i>Yersinia</i> adhesin A
Inv	Invasin	YEP-	<i>Yersinia enterocolitica</i> Plasmid nega- tiv
kb	Kilobasen	YEP+	<i>Yersinia enterocolitica</i> Plasmid posi- tiv
KBE	Kolonie bildende Einheiten	Yops-	<i>Yersinia</i> outer Proteins
LM	Lebensmittel		
LPS-	Lipopolysaccharid		
MAC	Membrane Attack Complex		

INHALTSVERZEICHNIS

Persönliche Erklärung iii

Danksagung v

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS vii

INHALTSVERZEICHNIS viii

1 Einleitung **1**

1.1 Kontamination von Lebensmitteln durch Mikroorganismen **1**

1.2 *Yersinia enterocolitica* **2**

 1.2.1 Pathogenitätsmechanismen 3

 1.2.2 Kultivierung 6

 1.2.3 Vorkommen und Übertragungswege 7

 1.2.4 Infektionsablauf 9

 1.2.5 Symptomatik/Sequelae 10

 1.2.6 Sonderfall in der Transfusionsmedizin 11

 1.2.7 Nachweis von *Yersinia enterocolitica* im Blut 13

 1.2.8 Spenderscreening hinsichtlich einer Infektion mit *Yersinia enterocolitica* 14

 1.2.9 Epidemiologische Situation in Deutschland 15

1.3 Vollblut und seine Blutkomponenten **18**

 1.3.1 Erythrozytenkonzentrat (EK) 21

 1.3.2 Thrombozytenkonzentrat (TK) 22

 1.3.3 Gefrorenes Frischplasma (GFP) 22

1.4 Antimikrobielle Eigenschaften des Blutes **23**

1.5 Leukozytenfiltration (LF) **26**

1.6 Transfusionsbedingte bakterielle Infektionen (TBBI) **29**

 1.6.1 Transfusionsbedingte bakterielle Infektionen durch Thrombozytenkonzentrate 30

1.6.2	Transfusionsbedingte bakterielle Infektionen durch Plasma	31
1.6.3	Transfusionsbedingte bakterielle Infektionen durch Erythrozytenkonzentrate	31
1.6.4	In Deutschland eingeführte Präventivmaßnahmen	32
1.7	Ziel der Arbeit	33
2	Material und Methoden	34
2.1	Mikroorganismen	34
2.2	Kultivierung von Mikroorganismen	34
2.2.1	Fest- und Flüssignährmedien.....	35
2.2.2	Kultivierung in automatischen Kultursystemen.....	35
2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl von Mikroorganismen	38
2.4	Stammhaltung	38
2.5	Herstellung der Standards	39
2.5.1	Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes	39
2.5.2	Kultivierung und Ernte.....	40
2.5.3	Auftauen eines Standards	41
2.5.4	Bestimmung der Zellzahl einer hergestellten Charge.....	41
2.5.5	Stabilitätstestung der Bakterienzahl.....	41
2.6	Identifizierung von <i>Yersinia enterocolitica</i>	41
2.6.1	Makroskopische Charakterisierung	41
2.6.2	Kulturelle Differenzierung von <i>Yersinia enterocolitica</i>	42
2.6.3	Mikroskopische Differenzierung.....	42
2.6.4	Biochemische Charakterisierung	43
2.6.5	Molekularbiologische Methoden	44
2.7	Molekulargenetischer Nachweis des Virulenzplasmids von <i>Yersinia enterocolitica</i>	44
2.7.1	DNA-Extraktion	44
2.7.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	44
2.7.3	Agarosegelelektrophorese.....	47

2.8	Wachstum von <i>Yersinia enterocolitica</i> in Blut	48
2.8.1	Kontamination von Blutbeuteln	48
2.8.2	Entnahme von Proben aus kontaminierten Beutelsystemen	49
2.8.3	Wachstum in Erythrozytenkonzentraten	49
2.8.4	Wachstum in Thrombozytenkonzentraten	51
2.8.5	Wachstum in Gefrorenem Frischplasma	52
2.8.6	Artifizielle Kontamination von Vollblut.....	53
2.9	Leukozytenfiltration von Blutkomponenten	61
2.9.1	Filtration mit der Matrix NaCl.....	63
2.9.2	Filtration mit der Matrix Additivlösung	64
2.9.3	Filtration mit leukozytendepletiertem Erythrozytenkonzentrat (EKf)	65
2.9.4	Filtration mit nicht leukozytendepletiertem Erythrozytenkonzentrat (EK)	66
2.10	Fraktionierung von Vollblut	67
3	Ergebnisse	68
3.1	Herstellung eines plasmidhaltigen Bakterienstandards von <i>Yersinia enterocolitica</i>	68
3.1.1	Kultivierung von plasmidhaltiger <i>Yersinia enterocolitica</i>	68
3.1.2	Kalziumgehalt im Kulturmedium	68
3.1.3	Inkubationstemperatur	70
3.1.4	pH-Wert des Mediums	70
3.1.5	Anzucht und Stammhaltung	70
3.2	Stabilität der hergestellten Bakterienstandards von <i>Yersinia enterocolitica</i>	71
3.2.1	Einfrierversuche.....	71
3.2.2	Stabilität der Bakterienzahl	71
3.3	Nachweis des Virulenzplasmids pYV während der Standardherstellung	73
3.4	Quantifizierung der plasmidtragenden Zellen	74
3.4.1	Differenzierung der plasmidhaltigen und plasmidlosen Zellen anhand der Koloniegröße im Standard PEI-A-101-02	74

3.4.2	Bestimmung der Rate an plasmidhaltigen Zellen im Standard	75
3.4.3	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	77
3.5	Wachstum von <i>Yersinia enterocolitica</i> in Blutprodukten	77
3.5.1	Wachstum in Erythrozytenkonzentraten.....	77
3.5.2	Wachstum in Additivlösung (PAGGS-M).....	80
3.5.3	Wachstum in Thrombozytenkonzentraten	81
3.5.4	Wachstum in Frischplasma.....	83
3.6	Abreicherung von <i>Yersinia enterocolitica</i> durch Leukozytenfiltration mit unterschiedlichen Matrices	84
3.6.1	LF 1 - Leukozytenfiltration mit der Matrix NaCl (0,85%)	85
3.6.2	LF 2 - Leukozytenfiltration mit der Matrix Additivlösung (PAGGS-M)	87
3.6.3	LF 3 - Leukozytenfiltration mit leukozytendepletiertem ErythrozytenKonzentrat	89
3.6.4	LF 4 - Leukozytenfiltration mit nicht leukozytendepletiertem ErythrozytenKonzentrat ...	93
3.7	Verteilung von <i>Yersinia enterocolitica</i> nach Fraktionierung des Vollblutes (VF)	94
3.7.1	Herstellung von EK und Plasma (VF Nr.1)	94
3.7.2	Herstellung von TK aus Buffy-Coat (VF Nr. 2)	96
3.8	Darstellung von <i>Yersinia enterocolitica</i> in einer Vollblutspende	96
3.8.1	Vollblut-Versuch VB Nr. 1 (ein Vollblut)	98
3.8.2	Vollblut-Versuch VB Nr. 2 (18 Vollblute)	99
4	Diskussion.....	104
4.1	Die Spezies <i>Yersinia enterocolitica</i>	104
4.2	Virulenzmarker	104
4.3	Quantifizierung der plasmidhaltigen Bakterienzellen	105
4.4	Wechselwirkungen mit dem Leukozytenfilter	106
4.4.1	NaCl (LF 1) und Additivlösung (LF 2).....	107
4.4.2	Matrix ‚EK filtriert‘ (LF 3)	110
4.4.3	Matrix ‚EK unfiltriert‘ (LF 4)	114

4.5	Wachstum von <i>Yersinia enterocolitica</i> im Blut	116
4.5.1	Wachstum in Plasma (GFP).....	118
4.5.2	Wachstum in Erythrozytenkonzentrat.....	120
4.5.3	Wachstum in Additivlösung.....	123
4.5.4	Wachstum in Thrombozytenkonzentrat.....	123
4.5.5	Wachstum in frischem Vollblut.....	124
4.6	Verteilung der Bakterien in den Komponenten nach Fraktionierung	127
4.7	Ausblick	133
5	Zusammenfassung.....	138
6	Summary.....	140
7	Literaturverzeichnis.....	142

1 EINLEITUNG

1.1 KONTAMINATION VON LEBENSMITTELN DURCH MIKROORGANISMEN

Viren, Bakterien und Pilze, bzw. deren Toxine sind häufig an der Kontamination von Lebensmitteln beteiligt und können durch ihre Aufnahme Gastroenteritiden auslösen. Ihre Gegenwart führt zum Verderb des Lebensmittels und im Folgenden meist zur Erkrankung des Menschen. Es wird hier zwischen Lebensmittelinfektion und Lebensmittelintoxikation unterschieden. Ersteres erfolgt direkt über die Mikroorganismen, die dann im Körper des Menschen spezifische Symptome auslösen (Fieber, Erbrechen, Durchfall, usw.) [1]. Lebensmittelintoxikationen werden durch die produzierten Toxine des Mikroorganismus ausgelöst. Diese sind meist hitzestabil und werden bei der Zubereitung der Lebensmittel nicht zerstört. Die Symptome sind hier ähnlich und können außerdem noch Krämpfe und Halluzinationen (z. B. bei Pilzen) hervorrufen [2].

Oft sind Eier und Eiprodukte, Fleisch und Fleischerzeugnisse, aber auch Milch und Milchprodukte sowie Fisch bzw. Meerestiere Auslöser von Lebensmittelvergiftungen. Kontaminationen dieser Nahrungsmittel können durch die Tiere selbst oder durch Übertragung bei der Schlachtung der Tiere entstehen. Eine Kontamination der genannten Nahrungsmittel kann durch eine Infektion des Tieres selbst, des Menschen oder durch Hygienemängel bei der Schlachtung der Tiere oder der Verarbeitung der Produkte entstehen. Die o.g. Produktgruppen bieten für eine Vermehrung, vor allem von Bakterien und Pilzen, geeignete Bedingungen [1–3].

Ob eine Spezies bzw. ein Stamm humanpathogene Eigenschaften besitzt und über Lebensmittel Infektionen verursachen kann, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Einerseits muss sich das Bakterium auf dem oder im Lebensmittel vermehren können, andererseits muss es die Fähigkeit besitzen, in den Wirtsorganismus einzudringen und sich gegen das wirtsspezifische Abwehrsystem zu behaupten. Auch die Infektionsdosis beeinflusst den Verlauf der Erkrankung. Abgesehen von der Virulenz, dem Ausprägungsgrad der pathogenen Eigenschaften des Erregers, ist die Stärke der sich darstellenden Symptomatik von der Immunkompetenz bzw. der Abwehrlage des Infizierten abhängig [2, 4].

Besondere Aufmerksamkeit gilt in dieser Arbeit der Bakterienspezies *Yersinia enterocolitica*, die der Erreger der dritthäufigsten Zoonose in Deutschland ist [5]. Zoonosen sind Infektionskrankheiten, die vom Tier auf

den Mensch bzw. von Mensch zu Tier übertragen werden können [2, 6]. Zur Spezies *Yersinia enterocolitica* gehören humanpathogene, aber auch für den Menschen nicht relevante Stämme [2, 7, 8].

1.2 YERSINIA ENTEROCOLITICA

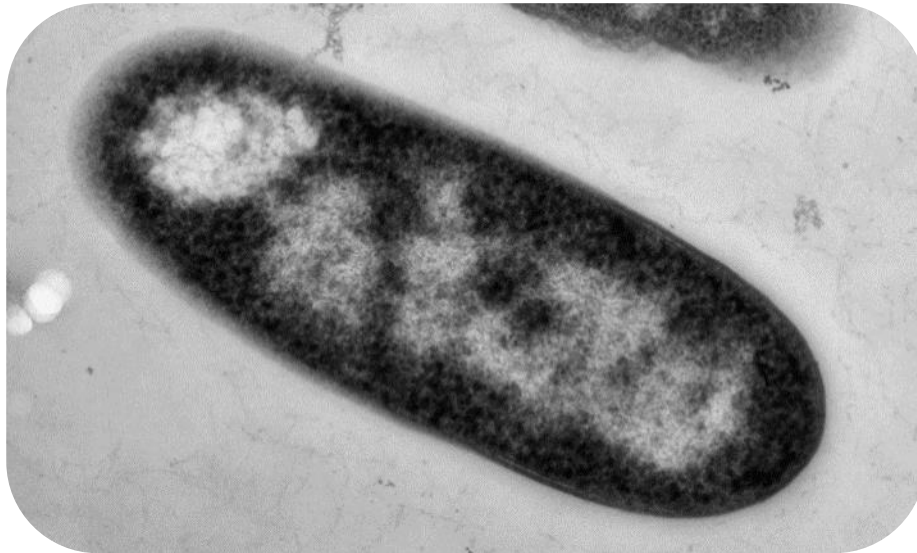


Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 (Aufnahmen: BOLLER, EBERLE, Paul-Ehrlich-Institut, 2015)

Die Gattung *Yersinia* gehört zu den gramnegativen, fakultativ anaeroben *Enterobacteriaceae*, die sich unter dem Mikroskop als kokkoide Stäbchen darstellen. Es gibt drei humanpathogene (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) und acht weitere Arten, die medizinisch für den Menschen nicht relevant sind (*Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. kristensii*, *Y. rohdei*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. ruckeri*) [9, 10]. Seit 2008 sind noch sechs weitere Spezies benannt worden: *Y. entomophaga* (2011), *Y. massiliensis* (2008), *Y. nurmii* (2011), *Y. pekkanenii* (2011), *Y. similis* (2008) und *Y. wauterii* (2014). Sie wurden genotypisiert und als „*Yersinia enterocolitica* ähnliche“ Spezies bezeichnet, da sie zwar zur Gattung *Yersinia* gehören, aber dennoch abweichende biochemische Eigenschaften besitzen [11–18].

Yersinia enterocolitica ist ein Oxidase negatives, Katalase- und Nitrat-Reduktase positives Bakterium. Zwischen 22°C und 28°C ist es peritrich begeißelt. Bei Körpertemperatur (37°C) werden keine Flagellen ausgebildet. Das Bakterium stellt sich abhängig vom Nährmedium pleomorph da, d.h. es kann nahezu kokkoid sein, aber auch als längliches Stäbchen in Erscheinung treten [19] und misst 0,5 bis 0,8 x 1-3 µm. Sein Temperaturoptimum liegt bei 28°C. Aber auch bei Temperaturen knapp über 0°C findet Stoffwechsel einschließlich Vermehrung statt (Psychrotoleranz) [20].

Serologisch werden *Yersinia enterocolitica*-Stämme aufgrund ihrer unterschiedlichen Lipopolysaccharid-Strukturen in über 60 Serogruppen unterteilt. Die am häufigsten von Patienten isolierten Serogruppen sind O:3, O:9, O:8 und O:5,27. In Europa werden meist die Serotypen O:3 und O:9 gefunden. Serovar O:8 hingegen ist bis vor einigen Jahren nur in den Vereinigten Staaten nachgewiesen worden [2, 21, 22]. Der Serotyp O:3, der ca. 90% der humanen Yersiniosen in Deutschland und auch in Europa verursacht, exprimiert verstärkt ein proteolytisch stabileres Invasin im Vergleich zu anderen Serotypen [21].

Biochemisch wird in fünf pathogene Biotypen (1B, 2, 3, 4 und 5) unterschieden [12]. Biovar 1A trägt die relevanten Pathogenitätsfaktoren nicht [8, 23, 24], besitzt dennoch Resistenzmechanismen gegen das menschliche Komplementsystem [7]. Die Beteiligung an einer Erkrankung der Variation 1A wird kontrovers diskutiert. Die Heterogenität dieses Biotyps schließt zumindest mögliche Pathogenitätsmechanismen nicht aus [7, 25, 26]. Die Biotypen 1B, 2, 3, 4 und 5 besitzen chromosomale und plasmidständige Virulenzfaktoren und können Infektionen beim Menschen auslösen [19, 27, 28].

1.2.1 PATHOGENITÄTSMCHANISMEN

Pathogene Stämme von *Yersinia enterocolitica* weisen Virulenzfaktoren auf, die auf Pathogenitätsinseln liegen und die Infektion des Wirtes triggern. Diese Inseln sind sowohl chromosomal lokalisiert als auch plasmidständig [23, 28].

Ail (Attachment and invasion locus) ist ein 17 kDa großes integrales Membranprotein der äußeren Zellmembran, das gemeinsam mit dem Protein Invasin (Inv) die Anheftung und das Eindringen von Bakterien in Wirtszellen vermittelt. *Ail* ist chromosomal lokalisiert und wird bei 37°C optimal exprimiert. Zusammen mit *YadA* spielt es eine wichtige Rolle bei der Serumresistenz [25, 29, 30]. In Experimenten konnte die Funktionalität auch ohne *YadA* gezeigt werden. [7, 25, 29, 31, 32].

Inv (Invasin) ist ebenfalls ein chromosomal kodiertes Protein, das auf der äußeren Zellmembran lokalisiert ist und für die effektive Einwanderung der Bakterienzellen in die Gewebe verantwortlich ist. Durch die hochaffine Bindung von Inv an das Transmembranprotein β 1-Integrin der M-Zellen (spezialisierte immunkompetente Darmepithelzellen der Peyer'schen Plaques) wird der Transzytosetransport der Bakterienzellen über die M-Zellen ausgelöst [33–37].

Durch Zell-Zell-Kontakt im Gewebe wird die Aufnahme von *Y. enterocolitica* in das tiefer liegende Gewebe vermittelt. Insbesondere bei Temperaturen zwischen 23 und 26°C produzieren die Bakterien viel Invasin. Im Gegensatz zu anderen enteropathogenen *Yersinia* Stämmen wird in Serotyp O:3 die Expression von *inv*

nicht temperaturabhängig geregelt und erfolgt konstant. Deshalb wird dieser Serotyp als virulenter betrachtet als die übrigen Vertreter anderer Serogruppen [21, 38].

Yersinia adhesin A (**YadA**) ist ein plasmidkodierte Protein der Außenmembran von *Yersinia*-Zellen. Es wird als multifunktionaler Virulenzfaktor gesehen, da es sich sowohl an extrazelluläre Matrixproteine von Wirtszellen anheften kann, aber auch Komplement-Faktoren (C3-Faktoren) des Wirtes binden und somit die Bakterienzelle vor Lyse schützen [39]. *Yersinia*-Mutanten, die dieses Gen nicht mehr besitzen, sind in Ihrer Virulenz stark eingeschränkt [28, 40]. Das membran-assoziierte Protein bildet eine fibrilläre Struktur auf der Oberfläche der Bakterienzelle aus, die für die verbesserte Anheftung an Körperzellen verantwortlich sein könnte [41].



Abbildung 1-2: Yersinien (in blau) dringen in Hep2-Zellen ein. Foto: Manfred Rohde / HZI

Die Anwesenheit des Plasmids pYV (plasmid for *Yersinia* Virulence) ist obligatorisch für die Virulenz. Neben dem *yadA* sind auf dem Plasmid auch die Gene für *Yersinia* outer proteins (**Yops**) und des Typ III-Protein-Sekretions-Systems (TTSS oder *Yersinia* secretion complex (Ysc)-TTSS) kodiert. Die Yops sind befähigt, strukturelle Änderungen der Wirtszelle vorzunehmen und in deren Regulationsmechanismen einzugreifen. Das TTSS ist ein konservierter Multiproteinkomplex und bildet eine Nadel (Injectisom) aus, durch die sogenannte Effektor-Yops in die Zielzelle geleitet werden [42]. Nach Einschleusen in die Wirtszelle hemmen die Effektor Yops die proinflammatorische Zytokinproduktion und wirken Makrophagen gegenüber apoptotisch und pyroptotisch, um der Phagozytose zu entgehen [28]. Die sogenannten Translokations-Yops bilden Poren in der eukaryotischen Zellmembran, um den Transport in die Zielzelle zu gewährleisten. Die Produktion der Yops wird durch das *virF*-Operon (Virulence regulon transcriptional activator) gesteuert [43]. Es ist eine Region auf dem pYV Plasmid, die bei 37°C die Transkription von *YadA* und der Yops aktiviert [44, 45]. Sie wird durch Temperatur und Wirtszell-Kontakt gesteuert [46]. Der Genort des *Ysc*-TTSS von

Yersinia enterocolitica liegt auf dem Virulenzplasmid pYV, das nur in pathogenen *Yersinia*-Bakterienzellen vorkommt [28, 45, 47].

Die Expression dieser Proteine ist abhängig von äußeren Bedingungen, wie Temperatur (37°C) und niedriger Kalzium-Konzentration [48]. Eine niedrige Konzentration an Kalzium spiegelt die Situation in der Wirtszelle wider. Wachstumsexperimente von *Y. enterocolitica* ohne Kalzium und bei einer Temperatur von 37°C simulieren die Bedingungen im Blut und die Virulenzproteine werden exprimiert. Diese Situation erfährt *Y. enterocolitica* auch beim Eintritt in den Wirt und die Erhöhung der Umgebungstemperatur ist für viele pathogene Mikroorganismen ein sicheres Signal für die Aufnahme in den Körper. Beide Faktoren zusammen führen zur notwendigen Produktion der Proteine und zur Hemmung der Signalkaskade [47, 49–51]. Stämme, denen das Plasmid fehlt oder die es verloren haben, können sich im Wirt nicht vermehren und sind somit apathogen [23, 25].

Das pYV-Plasmid scheint außerhalb der Bakterienzelle in der Umwelt stabil zu sein, was durch verschiedene Publikationen belegt wurde [49, 52]. Für die Kultivierung von pathogenen *Y. enterocolitica* im Labor hingegen müssen verschiedene Parameter eingehalten werden, um das Plasmid zu stabilisieren [49].

Bei Temperaturen unter 25°C erhält die virulente *Yersinia enterocolitica* das pYV-Plasmid, die darauf codierten Proteine werden jedoch nur in geringen Mengen synthetisiert und im Zytoplasma gelagert. Durch den Anstieg der Temperatur, nach einer Aufnahme von *Y. enterocolitica* durch kontaminierte Nahrungsmittel (z. B. Eis, Schweinefleisch), werden die Virulenzfaktoren in großer Menge exprimiert, die für den pathogenen Verlauf notwendig und verantwortlich sind [25, 47, 53–55].

Phänotypisch kann man das Ca-abhängige Wachstum bei 37°C auf geeigneten Nährböden erkennen. Die Verknappung an Ca²⁺-Ionen wirkt sich auf die Proliferationsgeschwindigkeit aus. Aufgrund des langsameren Wachstums kann man die plasmidhaltigen kleineren von den plasmidlosen größeren Kolonien differenzieren. Da die Produktion der plasmidkodierten Virulenzfaktoren stark induziert ist, wird das Wachstum der Bakterien durch die begrenzt zu Verfügung stehenden Metabolite einschränkt [56].

Die Hemmung des Wachstums durch Kalzium-Mangel und die massive Produktion der Virulenzfaktoren bei 37°C wird als Anpassung des Bakteriums auf den Wirtsorganismus, insbesondere auf die Zusammensetzung des Zytosols der Leukozyten verstanden [57].

Lipopolysaccharide (LPS) sind integrale Bestandteile der gramnegativen äußeren Bakterienzellmembran. Es sind Kohlenhydratstrukturen, die das angeborene Immunsystem als „fremd“ erkennt (PAMP=pathogen associated molecular pattern). LPS bildet mit dem LPS-Bindungsprotein (LBP) einen Komplex und gilt als starker Aktivator von Makrophagen und Komplementsystem [58].

Die Struktur des LPS ist temperaturabhängig. Bei Temperaturen zwischen 35 und 37°C sind molekulare Veränderungen in der Zucker und Fettsäurezusammensetzung zu beobachten. Bakterienzellen, die bei 25°C wachsen, haben die O-Antigen-Seitenketten vollständig ausgebildet (smooth). Diese können sich von der Membran ablösen und als freies Endotoxin wirksam werden. Die rauhe kurzkettige Form, die bei Körpertemperatur gebildet wird, ist in der Zellmembran fest integriert. Dies könnte die fehlende Symptomatik bei infizierten Personen erklären, die für eine gramnegative Sepsis typisch ist [8, 25, 48].

1.2.2 KULTIVIERUNG

Bei einigen Bakterienspezies ist auf ihrem Plasmid eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika verankert. Der Selektionsdruck zwingt diese Bakterien bei Zugabe der jeweiligen Antibiotika das Plasmid zu erhalten. Im Fall von *Yersinia enterocolitica* liegt auf dem Virulenzplasmid pYV kein Genort für eine Antibiotika-Resistenz vor [59, 60].

Zum Erhalt des Virulenz-Plasmids bzw. zum Exprimieren der Pathogenitätsfaktoren müssen in der Umgebung der Bakterien verschiedene äußere Bedingungen eingehalten werden, um ein Überleben im Menschen zu ermöglichen. Durch bestimmte Medienzusätze und Bedingungen während der Kultivierung kann der Verlust des extrachromosomalen DNA-Moleküls vermieden werden. Auf diesem befinden sich die Gene der Proteine, die zur Invasion in den Wirt und zur Abwehr der wirtsspezifischen Immunabwehr benötigt werden [42, 51, 61–65]. Die Arbeitsgruppe von Li untersuchte das Wachstum, den Erhalt des Plasmids und die Expression der Proteine bei unterschiedlichen Bedingungen (Körpertemperatur, Kalziumkonzentration, pH). Der pH-Wert hatte einen stabilisierenden Einfluss auf den Erhalt des Plasmids im Medium. Im Vergleich wuchsen die Yersinien bei neutralem pH schneller. Dennoch war die Stabilität zur Erhaltung des Plasmids deutlich vermindert. Maximale Stabilität konnte mit einem pH von 5,5 erreicht werden. In Untersuchungen mit unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen $[Ca^{2+}]$ konnte bei einer $[Ca^{2+}]$ über 245 μM und einer Temperatur von 32°C die Plasmidstabilität in Kultur gewährleistet werden. Bei Werten von 745 μM und 37°C konnte kein Verlust des Plasmids aber die Exprimierung der Yops beobachtet werden [49].

Zum phänotypischen Nachweis des Virulenzplasmids können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Zum Beispiel können plasmidhaltige von plasmidlosen *Yersinia enterocolitica* bei Anzucht auf festen Nährböden unterschieden werden. Durch das mit verlangsamte Wachstum der plasmidhaltigen Bakterien auf Kalziummangelmedien erscheinen diese als winzige, stecknadelkopfgroße Kolonien im Vergleich zu den größeren milchigen plasmidlosen Vertretern [66]. Der Nachweis des Virulenzplasmids pYV von *Yersinia*

enterocolitica in Kultur kann auch mit Kongorot oder Kristallviolett erfolgen. Es ist ein Test zur Differenzierung von plasmidhaltigen und plasmidlosen Zellen in Kultur. Der Nachweis erfolgt auf Nährmedium, das mit Kongorot bzw. Kristallviolett versetzt ist. Plasmidtragende *Yersinia enterocolitica* Kolonien nehmen den Farbstoff auf und erscheinen nach Aufnahme und Inkubation bei 35°C-37°C für 24 bis 48 Stunden als stecknadelkopfgroße, runde, konvexe, undurchsichtige rote/violette Kolonien. Die apathogenen Vertreter wachsen als große weiße, etwas ungleichmäßigere, flache und durchscheinende Kolonien [12, 66–70]. Als weiterer Test für plasmidhaltige *Y. enterocolitica* wird der Agglutinationstest angewendet, der auf der Reaktion von Agglutinin mit dem plasmidkodierten YadA Protein beruht und zu einer sichtbaren Verklumpung führt. Auch Tierversuche können zum Pathogenitätsnachweis eingesetzt werden (*Yersinia enterocolitica*-vermittelte Konjunktivitis bei Meerschweinchen oder in Mäusen) [12, 66]. Weiterhin sind molekularbiologische Verfahren etabliert. Diese beruhen auf dem Nachweis von spezifischen Genregionen des pYV Plasmids und Pathogenitätsfaktoren auf dem Chromosom von pathogenen *Yersinia enterocolitica* Spezies und gelten als sicher, schnell und recht sensitiv [71–74].

1.2.3 VORKOMMEN UND ÜBERTRAGUNGSWEGE

Yersinia Arten kommen weltweit vor, sind aber vornehmlich in Europa, Asien, Australien, Südafrika und Amerika zu finden. In tropischen Gebieten findet man sie selten. Die Spezies ist in der Umwelt weit verbreitet [75]. Dementsprechend gelangt es oral-alimentär über die Nahrungskette in Tier bzw. Mensch. Das Hauptreservoir ist das Schwein, das Bakterium wurde aber auch aus anderen tierischen und pflanzlichen Nahrungsmitteln, sowie Trinkwasser isoliert. Da *Yersinia enterocolitica* psychrotolerant ist, kommt diesem gramnegativen Bakterium auch hier besondere Bedeutung zu, denn die Vermehrung kann auch bei gekühlt gelagerten Lebensmitteln stattfinden [76].

Es sind ausdauernde und anspruchslose Mikroorganismen, die über einen langen Zeitraum die Fähigkeit besitzen in der natürlichen Umwelt zu überleben. Auch bei extrem niedrigen Temperaturen können sie ihren Stoffwechsel aufrechterhalten, was sehr vorteilhaft für die möglicherweise lange Überdauerungszeit bis zur oralen Aufnahme ist [48].

Als vornehmliche Quelle von humanpathogenen *Yersinia enterocolitica* werden Hausschweine beschrieben. Sie sind mehr oder weniger häufig infiziert und scheiden den Erreger auch nach mehreren Wochen noch über den Darm aus. Die Erreger werden in den Tonsillen und der Zunge, sowie in Darm und Faeces infizierter Schweine gefunden. Es wird vermutet, dass sich die Bakterien in den Tonsillen der Schweine anreichern [26]. *Yersinia enterocolitica* disseminiert im menschlichen Körper über das

Lymphsystem, was die Aussage von Nesbakken untermauert [28, 75]. Bei einer Untersuchung von Schweinefleisch, bei dem Kopffleisch (Schweinebäckchen und Tonsillen) mitverarbeitet wurde, konnten vermehrt pathogene Stämme nachgewiesen werden [77, 78].

Die Infektion kann bei Schweinen, wie auch beim Menschen, asymptomatisch bzw. latent verlaufen. Unter ungünstigen Bedingungen kann es auch zur Erkrankung der Tiere (Yersiniose) kommen [77]. Aufgrund der intensiven Tierhaltung, der industriellen Fleisch- und Nahrungsmittelproduktion mit langen Lagerzeiten und Kühlketten, sind Übertragungen von einem Tier auf das andere bzw. die Anreicherung von psychrophilen Mikroorganismen im Lebensmittel wahrscheinlich [26].

Über nicht ausreichend durchgegartes oder roh verzehrtes Schweinefleisch werden die Bakterien oral aufgenommen [5]. In Belgien wurde eine Reihe erkrankter Patienten untersucht und sowohl O:3, also auch O:9 Stämme isoliert. Alle Infektionen wurden mit der Aufnahme von rohem Schweinefleisch assoziiert [79].

Rind- und Lammfleisch kann durch Kreuzkontamination mit *Yersinia enterocolitica* belastet sein. Durch die Zubereitungsweise wird das Fleisch nicht immer durchgegart und mögliche Kontaminationen werden dadurch nicht eliminiert. Auch aus Ziegen, Schafen und Wildtieren wurden pathogene Stämme von *Yersinia enterocolitica* isoliert [26].

Mit *Yersinia enterocolitica* kontaminierte Milch und Milchprodukte werden ebenfalls in der Literatur als übertragende Lebensmittel beschrieben. Rinder können an Yersiniose erkranken und somit Überträger sein, werden aber nicht als ursprüngliche Kontaminationsquelle gesehen, da diese Stämme nicht humanpathogen sind [26]. Es wird vermutet, dass die betroffenen Lebensmittel im Laufe der Verarbeitung mit dem Erreger in Kontakt kommen [78].

Im Jahr 2011 wurde in den USA ein Ausbruch mit 22 Infektionen *Yersinia enterocolitica* registriert. Die Infektion wurde durch ungenügend pasteurisierte Milch und Milchprodukte einer Molkerei übertragen [80]. Ausbrüche durch Schokoladenmilch und Sojaprodukte wurden bereits in früheren Jahren beschrieben [26]. Auch in anderen Ländern (Australien, Kanada, Tschechien/Slowakei) konnten pathogene Stämme von *Yersinia enterocolitica* aus pasteurisierter Milch isoliert werden. Auch hier wurde ungenügende Erhitzung der Milch für die Kontaminationen verantwortlich gemacht [71]. Nichtsdestotrotz wurden in Milch und Milchprodukten auch immer wieder apathogene Stämme gefunden, die für den Konsumenten keine Gefahr darstellen [26].

Yersinia enterocolitica kann aus Boden und Oberflächenwasser isoliert werden. Es wird angenommen, dass die Mikroorganismen über Ausscheider tierischen Ursprungs in den Boden und in Wasserreservoirs gelangen, wie z.B. über infizierte Vögel oder Wild [78].

Für die Kontamination von Gemüse (Salat, Karotten, verzehrfertiges Gemüse) werden unterschiedliche Infektionsursachen angegeben, zum Beispiel Düngung, Transport, Verarbeitung sowie Kontakt mit infizierten Lebensmitteln und/oder Tieren) [71, 81, 82]. Die Kontamination erfolgt bei diesen Lebensmitteln allerdings sekundär [71, 75]. Die meisten der auf und in Lebensmitteln gefundenen Stämme gehörten zu Biovar 1A [25].

Es finden auch Transmissionen von Mensch zu Mensch statt. Dieser Übertragungsweg ist sehr selten. Es sind einzelne Fälle beschrieben, in denen die Infektion durch mangelnde Hygiene auf andere Familienmitglieder übertragen wurde.

Bottone zitiert mehrere nosokomiale Ausbrüche durch *Yersinia enterocolitica*, von denen vermutet wird, dass sie von Mensch zu Mensch übertragen wurden. Allerdings wurde die Kasuistik nicht eindeutig geklärt. Die erkrankten Personen waren entweder gesundheitlich oder durch ihr Alter beeinträchtigt. Das Risiko einer Infektion ist bei diesen Personengruppen im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht [7, 25].

Auch eine Übertragung von Mensch zu Mensch durch Transfusion ist möglich [25, 83]. Gelangt *Yersinia enterocolitica* in eine Blutspende, ist die Symptomatik der Yersiniose beim Spender meist inapparent verlaufen. Beim Spender-Screening fällt der Infizierte durch fehlende Symptome (Bauchschmerz oder Durchfall) nicht auf und kann die Bakterien durch eine Bluttransfusion weitergeben [28], [8, 25, 84]. Die Folgen sind meist fatal für den Empfänger der mit *Yersinia enterocolitica* kontaminierten Blutkomponente und führt in über der Hälfte der Fälle zum Tode [85].

1.2.4 INFektionsablauf

Voraussetzung für einen Krankheitserreger ist, dass er sich, sobald er vom Wirt aufgenommen wird, schnell an seine neue Umgebung adaptiert. Er muss Schutzbarrieren überwinden, in den Organismus eindringen und sich gegen die vorhandenen Abwehrmechanismen durchsetzen, um sich vermehren zu können [51, 86].

Yersinia enterocolitica gelangt nach der oralen Aufnahme in den Magen. Um das saure Milieu zu überstehen, produziert es das chromosomal kodierte Enzym Urease [87]. Dieses spaltet den mit der Nahrung aufgenommenen Harnstoff in Ammoniak und CO₂. Die Bakterienzelle kann so den pH- Wert des direkten Umfeldes etwas erhöhen [86].

Im Dünndarm adhären die Bakterien an die intestinale Mukosa des terminalen Ileums und dringen mit Hilfe der Anlagerung von Invasin an β 1-Integrin durch die M-Zellen des follikel-assoziierten Epithels ein. Sie besiedeln die Peyer Plaques, proliferieren extrazellulär und breiten sich, möglicherweise auch innerhalb

von Phagozyten über das lymphatische System aus. Sie sind in den mesenterialen Lymphknoten, Milz, Leber und in der Blutbahn zu finden und vermehren sich dort extrazellulär. Sie bilden Mikrokolonien und sind so vor Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten geschützt [19, 47, 53, 65, 88, 89, 90].

Durch die Adhäsions- und Invasionsgene von pathogenen *Yersinien* ist das Anlagern an die Epithelzellen im Darm möglich. Sie liegen teilweise chromosomal (*ail*, *inv*), aber auch plasmidkodiert vor (*yadA*) [19]. Die Expressierung der plasmidkodierten Proteine erfolgt bei 32°C bis 37°C [49]. Es wird vermutet, dass diese auch bei 25°C schon exprimiert werden bzw. in kleiner Kopienzahl im Zytoplasma vorliegen, der Einbau in die äußere Zellmembran aber erst bei höheren Temperaturen erfolgt [25]. Die starke Immunantwort des Wirtes führt zur Zerstörung der proximalen Mukosa. So gelangen neu gebildeten *Yersinia*-Zellen ins Darmlumen, wo sie sich durch Infektion weiterer Epithelzellen ausbreiten [28]. In den Peyer'schen Plaques muss sich *Yersinia enterocolitica* gegen dort lokalisierte Immunzellen des Wirtes behaupten. Es bildet Cluster bzw. Mikrokolonien und bindet Invasin-vermittelt an die Zielzellen der unspezifischen Abwehr (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen). Die Bakterien hemmen deren Autolyse, indem sie mit Hilfe des Typ III-Protein-Sekretions-Systems (TTSS) *Yersinia* outer proteins (Yops) in das Zytoplasma der Wirtszelle einschleusen [91]. Im Blut bleibt *Ail*- und *YadA*-reguliert bei 37°C die Komplementaktivierung aus und resultiert in einer erhöhten Serumresistenz der Bakterienzellen [29, 37, 72]). Die betroffenen phagozytierenden Immunzellen werden in den programmierten Zelltod geschickt [19, 25, 53, 88].

Das zur Enzyymbildung notwendige freie Eisen, das durch die niedrige Konzentration im Blut einen limitierenden Wachstumsfaktor von Mikroorganismen darstellt, nimmt *Yersinia* durch die hochaffinen Siderophoren-Rezeptoren auf [8, 28].

Der dargestellte Invasionsmechanismus ist nur bei plasmidhaltigen Stämmen (= pathogenen Stämmen) vorhanden. Diese Virulenz von *Yersinia* wird nicht selten Sero- bzw. Biovaren zugeordnet, wobei die eigentlichen Pathogenitätsfaktoren (Besitz des Plasmids, *ail*) und nicht nur die Zugehörigkeit zu einem bestimmten Serotyp bzw. das biochemische Verhalten von Bedeutung ist [92].

1.2.5 SYMPTOMATIK/SEQUELAE

Enteropathogene *Yersinia*-Stämme sind für ein breites Spektrum von Krankheiten verantwortlich, die sich je nach Alter des Patienten, Immunstatus, Anzahl der aufgenommenen Keime und pathogener Serogruppe unterschiedlich auswirken [28]. Es kann zu einer Enterokolitis kommen, zu einer terminalen Ileitis bzw.

einer mesenterialen Lymphadenitis führen oder sich in einer Septikämie manifestieren. Häufiges Symptom bei Erwachsenen ist eine wässrige, evtl. auch blutige Diarrhö. Kinder reagieren eher mit Fieber, Erbrechen und Bauchschmerz. Systemische Verläufe sind selten und treten vor allem bei mit schweren Grunderkrankungen vorbelasteten Patienten auf. Postinfektiöse Folgeerkrankungen (Sequelae) müssen antibiotisch behandelt werden [8].

Insbesondere Patienten mit erhöhtem Eisenspiegel im Blut (hämolytische Anämie, therapeutische Eisensubstitution), die die uneingeschränkte Versorgung des Bakteriums mit Eisen gewährleisten, sind anfällig für Septikämien [28, 75]. Hier liegt die Mortalitätsrate bei ca. 50%, da meist Organe wie Milz, Leber, Lunge, Herz mitbetroffen sind [28].

Ein Spender mit symptomloser, unerkannter Yersiniose kann ein Risikofaktor für eine Übertragung mit Blut sein, da sich der psychrotolerante Keim bei einer Lagertemperatur von 4°C im Erythrozytenkonzentrat (EK) anreichern kann und durch die Transfusion eine große Menge von Bakterien und Endotoxin in den Empfänger gelangt, was für diesen lebensbedrohlich ist [75].

1.2.6 SONDERFALL IN DER TRANSFUSIONSMEDIZIN

In der Transfusionsmedizin ist *Yersinia enterocolitica* aufgrund ihrer Psychrotoleranz und Adaptionsfähigkeit an die Umgebung von besonderer Bedeutung. Bis zur Jahrtausendwende war diese Spezies an knapp der Hälfte der transfusionsbedingten Zwischenfälle durch Erythrozytenkonzentrate beteiligt [93, 94]. Die dadurch entstehenden Komplikationen verlaufen nicht selten tödlich [25, 95–97]. Die Inzidenz einer Übertragung von *Yersinia enterocolitica* durch EK wird von der WHO auf 1: 6 Millionen EK-Transfusionen geschätzt [98].

Um in ein EK zu gelangen, muss *Yersinia enterocolitica* mehrerer Hürden überwinden: Die Bakterien gelangen über kontaminierte Nahrungsmittel in den Darm des Spenders, entziehen sich der wirtsspezifischen Abwehr, vermehren sich in den Peyer Plaques und disseminieren über die Lymphbahnen. Durch die erfolgreiche Hemmung der Immunantwort verläuft die Infektion mit *Yersinia enterocolitica* inapparent und aufgrund fehlender Diagnostik und ausbleibender Symptomatik erfolgt die Freigabe zur Blutspende. So ist es möglich, dass auch bei sorgsamer vorheriger Befragung und Untersuchung des Spenders eine *Yersinia*-Bakteriämie nicht immer erkannt wird. In der Literatur werden für bakteriämische Spender Keimzahlen von 1 bis 100KBE/ml Blut angegeben, teilweise sogar 0,03 bis 0,3KBE/ml [8, 83, 94, 99]. Durch die initial niedrige Keimzahl im Blut und die fehlende Freisetzung von Entzündungsmediatoren

können erwartete Symptome (Enterokolitis, Abdominalschmerz) ausbleiben, schon Tage bis Wochen zurückliegen oder erst nach der Spende auftreten [8, 83, 100].

Auch die anfänglich geringe Endotoxinbelastung verursacht beim Spender keine symptomatischen Beschwerden und gibt somit keinen Hinweis auf eine Erkrankung. Dies ist durch die kurzkettenartige Struktur der Endotoxine bedingt, die in dieser Form als membranständige Lipopolysaccharide der gramnegativen Bakterien vorkommen [8, 101].

Der Erreger gelangt durch das Blut des Spenders in das Beutelsystem. Nach der Blutseparation proliferieren die Bakterien - durch die niedrige Lagertemperatur etwas verzögert - innerhalb von zwei bis drei Wochen in der EK-Komponente, da die Teilungsrate der Bakterien bei kalten Temperaturen eingeschränkt ist [102]. Der Eisenbedarf von *Yersinia enterocolitica* wird durch den beginnenden Zerfall der Erythrozyten und dem somit frei werdenden Hämoglobin-Eisen gedeckt [8].

Bedingt durch die niedrige Lagertemperatur der EKs wird die langkettige Form der Lipopolysaccharide gebildet. Diese können sich von der äußeren Bakterienmembran ablösen und als freies Endotoxin wirksam werden. In der Absterbephase der Bakterien werden die Lipopolysaccharide vermehrt aus der Membran freigesetzt und reichern sich mit zunehmender Lagerdauer im EK an [8, 25]. Die hohen Konzentrationen an LPS und die große Menge an Bakterien führen bei einer Transfusion zu einer sehr schweren, oft tödlich verlaufenden Sepsis des Rezipienten [8, 48, 97, 101, 103]. Die Stimulation der phagozytierenden Zellen durch das LPS und die daraus resultierende Zytokin-Ausschüttung, die in einer systemischen und unkontrolliert inflammatorischen Antwort mündet, wird als auslösender Faktor des septischen Schocks angesehen [28, 83].

Bei diesen fatalen Verläufen wurde die Lagerdauer der Komponenten von 21 Tagen meist überschritten [104]. Potenziell gefährliche Konzentrationen an Endotoxin können aber auch in kürzerer Zeit entstehen und eine verkürzte Haltbarkeit von EK schützt nicht in jedem Fall vor fatalen Verläufen [105].

Die Zahl der fatalen verlaufenden Transfusionsreaktionen durch *Yersinia enterocolitica* wird mit ca. 1: 10⁵ bis 1: 10⁷ transfundierter EKs angegeben [83]. Von 1975 bis 2007 wurden weltweit 55 Fälle einer Übertragung durch Erythrozytenkonzentrate publiziert. Die Mortalitätsrate wurde mit 54,5% berechnet. Bottone berichtete in seiner Publikation 1997 im Zeitraum zwischen 1975 und ca. 1996 von 27 (64%) tödlich verlaufenen Fällen [25, 83]. Da die Daten zu Transfusionsreaktionen weltweit bis Ende des letzten Jahrtausends nicht systematisch erfasst wurden, können die Zahlen für diese Zwischenfälle nur geschätzt werden [8]. Auch heutzutage ist die Rückverfolgbarkeit von bakteriell assoziierten Transfusionszwischenfällen durch fehlende Spenderbeutel nicht immer gegeben. Im SHOT-Report von 2012

werden beispielsweise zwei Fälle von bakteriell kontaminierten EKs aufgeführt, bei denen die Bakterien aufgrund dieser Tatsache nicht identifiziert werden konnten [106]. Im Jahr 2005 wurden in Frankreich zwei Fälle einer Übertragung mit *Yersinia enterocolitica* bekannt, die einen fatalen Ausgang hatten [83, 107]. In Italien starb im Jahr 2015 eine Frau an einer kontaminierten unfiltrierten EK-Komponente. Die Leukozytendepletion wurde dort indikationsbezogen durchgeführt [108, 109].

1.2.7 NACHWEIS VON YERSINIA ENTEROCOLITICA IM BLUT

Die Kultivierung in geeigneten Flüssigmedien ist eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis von Bakterien. Hierzu wird eine zu untersuchende Probe in Kulturmedium inokuliert und bei geeigneten Temperaturen über einen gewissen Zeitraum bebrütet. Der visuelle Nachweis erfolgt über Trübung und Subkultur zur Identifizierung. Die theoretische Nachweisgrenze liegt bei einer KBE/ml. Der Nachteil dieser sehr sensitiven Methode ergibt sich aus der langen Zeitspanne bis zur Freigabe der Blutkomponente, da erst bei einer recht hohen Keimzahl eine Detektion möglich ist [110]. Durch die oftmals vorhandene geringe Anfangskeimzahl im Blut des Spenders muss, im Vergleich zu Proben für den Nachweis von Viren, ein relativ großes Probenvolumen sowohl aerob als auch anaerob inkubiert werden. Die Beprobung sollte so spät wie möglich erfolgen, damit sich im Blut befindliche Bakterien vermehren können, um den Probenfehler so klein wie möglich zu halten („Sampling Error“). Da die Inkubationsmethoden, abhängig von der Adaptionsphase der Bakterien aber einen gewissen Zeitvorlauf benötigen, müsste die Probenahme sehr früh erfolgen, um ein Ergebnis vor Freigabe zu erhalten [111, 112].

Zur mikrobiologischen Kontrolle werden für die Testung von Blutkomponenten heutzutage in den Blutspendediensten Kulturautomaten verwendet, da das Beimpfen der Kulturmedien mit Blut bereits zu einer Trübung führt und eine visuelle Bewertung von mikrobiologischem Wachstum unmöglich macht. Dazu wird das Blut in Kulturflaschen injiziert und in einer speziell dafür vorgesehenen Inkubationseinheit bebrütet. Die Detektion im Kulturautomaten erfolgt über die Vermehrung der Bakterien pro Zeiteinheit durch kolorimetrische Messung der CO₂-Produktion von Mikroorganismen [113, 114].

In den letzten Jahrzehnten hat sich neben den Kulturverfahren die PCR zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* in Blut etabliert [23, 31, 32, 66, 115]. Es hat sich gezeigt, dass diese Spezies mit diesem Nachweisverfahren auch in Lebensmitteln detektiert werden kann [116–118]. Der Vorteil der molekularbiologischen Methoden besteht einerseits in der kurzen Detektionszeit, andererseits in der Diskriminierung von pathogenen und apathogenen Stämmen durch den Nachweis von plasmidkodierten

Zielgenen in der Probe [23, 31, 32, 66, 72, 119]. Vielversprechend ist auch der sensitive Nachweis aus Schweinefleisch, das als hauptsächliche Quelle für die Übertragung auf den Menschen gilt [120].

Zur Isolierung aus Lebensmitteln wurde früher die zeitaufwändige Kälteanreicherung auf Agarplatten angewandt. Da diese Spezies bei Kühlschranktemperaturen vermehrt werden kann, allerdings langsamer als bei höheren Temperaturen, wird das Wachstum der Begleitflora (beispielsweise in Faeces) unterdrückt [8]. Auch selektive Nährböden mit und ohne Antibiotikazusätze kommen zur Anwendung um diese Spezies anzureichern. Einige dieser Medien erlauben eine Aussage über den Plasmidbesitz der Zellen [67, 70, 119].

Die Serogruppenbestimmung erfolgt immunologisch über Agglutination, die Biogruppen werden biochemisch bestimmt [12, 229, 230].

1.2.8 SPENDERSCREENING HINSICHTLICH EINER INFektion MIT *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Die *Yersinia*-Bakteriämie eines unauffälligen Spenders lässt sich methodisch nicht eindeutig diagnostizieren. Serologische Untersuchungen durch Antikörpernachweis-Verfahren sind aufwendig und teuer. Bei einer Infektion bildet der Körper zunächst IgM-Antikörper gegen die Erreger. Dies geschieht in den ersten Tagen. Generell lassen sich IgM-Antikörper erstmals etwa nach einer Woche nachweisen. Im weiteren Verlauf sinkt die Konzentration der IgM-Antikörper wieder und wird durch den Anstieg von IgG- und IgA-Antikörpern abgelöst. Nach etwa 6-8 Wochen sind keine IgM-Antikörper mehr nachweisbar. Serologische Blutuntersuchungen können also gleich zu Anfang der Infektion, d.h. innerhalb der ersten Woche noch „falsch-negativ“ oder nach 6-8 Wochen schon wieder „falsch-negativ“ sein. Bei einem positiven IgM-Nachweis müsste der Spender ein zweites Mal auf einen Anstieg des AK-Titers (IgM) untersucht werden.

Die Häufigkeit positiver Serotyp-unabhängiger Tests (Kreuzreaktionen mit anderen gramnegativen Bakterien) und das häufige Vorkommen von Antikörpern in der deutschen Bevölkerung stehen hier im Kontrast zu den sehr seltenen *Yersinia*-spezifischen Transfusionsreaktionen. Die serologische Untersuchung der Spender wird deshalb in der Transfusionsmedizin nicht praktiziert [8, 25, 121].

Ein Erregernachweis im Stuhl durch Kälteanreicherung ist langwierig. Neben *Y. enterocolitica* werden dabei auch die apathogenen Vertreter dieser Gattung oder andere psychrophile, nicht relevante Bakterien vermehrt [8]. Die einzige Möglichkeit zur Prophylaxe besteht in der anamnestischen Erhebung von Durchfall innerhalb der letzten vier Wochen. Diese Vorgehensweise wird in den „Hämotherapie-Richtlinien“ berücksichtigt [122].

1.2.9 EPIDEMIOLOGISCHE SITUATION IN DEUTSCHLAND

Die Yersiniose ist eine durch hauptsächlich tierische Lebensmittel auf den Menschen übertragene Infektion mit *Yersinia enterocolitica* oder *Yersinia pseudotuberculosis*. Seit 2001 ist diese Erkrankung in Deutschland meldepflichtig. Der überwiegende Anteil der Yersiniosen kann auf *Yersinia enterocolitica* zurückgeführt werden. *Yersinia pseudotuberculosis* ist nur in geringem Maße beteiligt [50, 75].

Sie wurde 2010 im RKI Jahresbericht noch als die dritthäufigste bakterielle Zoonose in Deutschland beschrieben [123]. In der EU lag sie 2015 mit 6471 Fällen auch auf Platz drei, die Zahlen sind aber rückläufig [124]. Auch in Deutschland wurden 2014 weniger als 2500 Neuinfektionen an das Robert-Koch-Institut gemeldet. Im Jahr 2002 (höchster Infektionsrate) dagegen lag die Zahl noch bei 7515 Fällen. Im Jahr 2011 stieg die Anzahl der gemeldeten Fälle wieder etwas an. Vermutlich war die Bevölkerung durch den damaligen HUS/EHEC-Ausbruch sensibilisiert und es erfolgten mehr Arztbesuche. Die Zahl fiel dann weiter bis 2014 ab und hat in diesem Jahr den niedrigsten Wert seit Erfassung erreicht (s. **Abbildung 1-3**). Im Jahr 2015 stieg die Zahl der Yersiniosen wieder leicht an.

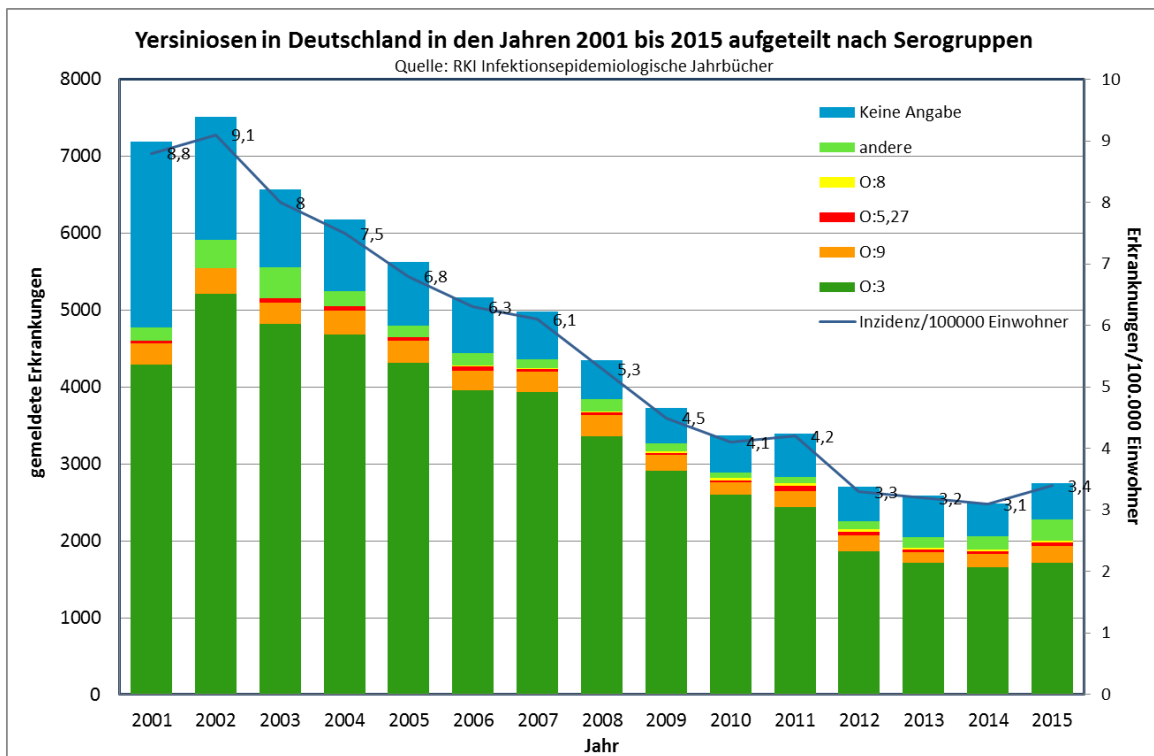


Abbildung 1-3: Gemeldete Erkrankungen verursacht durch *Yersinia enterocolitica* in Deutschland.

Nach *Rosner 2010, **Epidemiologisches Bulletin 2004, 43. 2001 trat erstmals in Deutschland eine Infektion des Serotyp O:8 auf [5]. In den Jahren 2002 und 2003 wurde keine Infektion mit dem Serotyp O:8 gemeldet. Darauf folgend gab es jährlich Neuerkrankungen [125].

In den infektionsepidemiologischen Berichten liegt die Inzidenz der Erkrankung bei einjährigen Kindern am höchsten, nimmt mit zunehmendem Alter ab und ist in allen Bundesländern recht konstant. Unterschiede in der Inzidenz zwischen den Bundesländern lassen sich hauptsächlich auf Schwankungen in der Altersgruppe „Kinder unter 5 Jahren“ zurückführen [5, 126].

Die Infektion wird vor allem durch ungenügend erhitztes Schweinefleisch übertragen. Im Jahr 2014 konsumierten im Durchschnitt Männer doppelt so viel Fleisch wie Frauen. Aufgetrennt in verschiedene Altersgruppen liegen die 19- bis 24-jährigen weiblichen Deutschen unter dem Durchschnitt, die Gruppe der 65- bis 80-jährigen etwas darüber, was wahrscheinlich an der steigenden Mortalitätsrate der Männer in dieser Altersgruppe liegt [127]. Auch 2015 lag die Infektionsrate von Yersiniosen bei Frauen in der Altersgruppe von 20 bis 39 Jahren unter der von Männern. Erst ab einem Alter von 50 Jahren und älter ist ein leichter Trend nach oben zu verzeichnen [126].

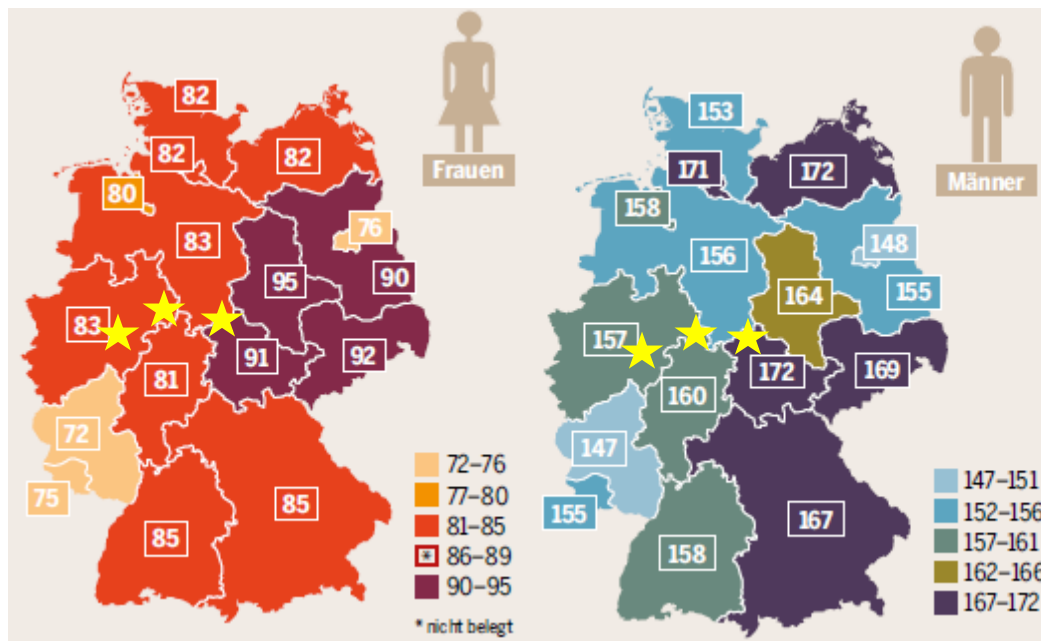


Abbildung 1-4: Fleisch- und Wurstverzehr nach Bundesländern und Geschlecht in Deutschland im Jahr 2015 in Gramm pro Tag. Quelle: Deutscher Fleischatlas 2016 (Heinrich Böll Stiftung und BUND)

In Thüringen, Sachsen und Sachsen-Anhalt (★) ist nach Angabe des Robert-Koch-Instituts die Rate der Neuansteckungen pro 100 000 Einwohner am höchsten. Im Fleischatlas 2016 ist die Verteilung des Fleischverzehrs nach Bundesländern aufgeführt (s. **Abbildung 1-4**). Die drei o.g. Bundesländer liegen auch hier an der Spitze des Fleischkonsums. Allerdings ist nicht aufgeführt, welche Art von Fleisch, in welchem Stadium der Verarbeitung und von welcher Altersgruppe konsumiert wurde [128]. Generell ist der Schweinefleischkonsum von 39,4 kg im Jahr 2011 auf 38,2 kg im Jahr 2014 pro Kopf leicht gefallen (s. **Abbildung 1-5**). Auch der Verbrauch ist seit 2001 recht konstant hat erst 2012 leicht abgenommen [129]. Schweinefleisch ist das am häufigsten konsumierte Fleisch in Deutschland. Daraus könnte die vergleichsweise hohe Prävalenz für Yersiniose in Deutschland im Vergleich zu anderen europäischen Ländern resultieren. Aber auch andere Faktoren wie Untersuchungs- und Isolationsmethoden, Meldehäufigkeit, Unterschiede in der Diagnostik, Underreporting, Lebensmittelverarbeitung, Durchseuchungsraten der Schweine, Verzehrgewohnheiten können hierbei eine Rolle spielen [5, 50, 130].

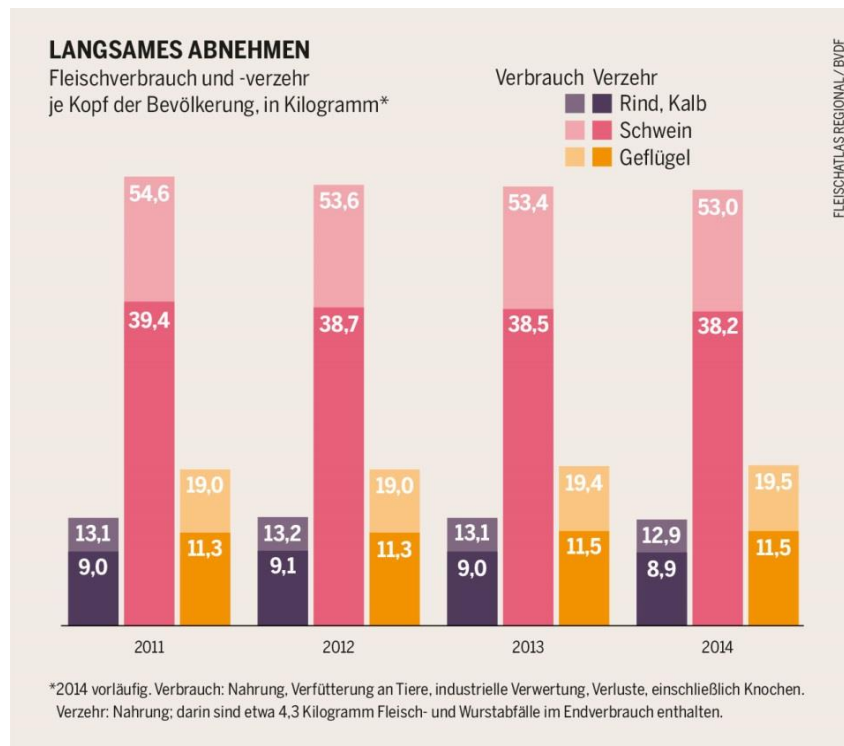


Abbildung 1-5: Fleischatlas regional 2016: Verbrauch und Verzehr von Fleisch in Deutschland von 2011 bis 2014 (angegeben in Kilogramm). Urheber: Heinrich-Böll-Stiftung, BUND / Dieses Bild steht unter einer Creative Commons Lizenz [129].

Es wird vermutet, dass verbesserte Lebensmittelkontrollen und Hygienemaßnahmen während der Lebensmittelverarbeitung für die sinkenden Zahlen der Neuerkrankungen verantwortlich sind [5]. Dennoch ist die Yersiniose eine Zoonose mit einer recht hohen Gesundheitsrelevanz bezüglich der Neuerkrankungsrate und den möglichen Folgeerkrankungen [5].

Aufgrund der oftmals leicht verlaufenden Symptomatik nach der Infektion ist eine Untererfassung der Fälle von Infektionen wahrscheinlich [131].

1.3 VOLLBLUT UND SEINE BLUTKOMPONENTEN

Blutprodukte sind Arzneimittel im Sinne des Arzneimittelgesetzes (AMG) bzw. des Transfusionsgesetzes (TFG). Ihre Anwendung und Kontrolle und sind national geregelt. Sie unterliegen den Vorschriften des Arzneimittelrechtes [132]. Die Herstellung von Blutkomponenten ist transfusionsmedizinischer Standard. Ihre Gewinnung erfolgt durch Vollblutspenden oder durch die jeweiligen Apherese-Verfahren. Die Her-

stellung von Blutkomponenten durch Apherese erfolgt über Zellseparatoren, die eine ausschließliche Gewinnung einer Komponente erlauben. Es werden je nach Zellart 500 bis 750 ml Aphereseblut gewonnen [122]. Im Weiteren wird auf die Verarbeitung von Vollblut in Deutschland eingegangen.

Bei der Vollblutspende werden 450 ml bis 500 ml Vollblut entnommen und in ein steriles, geschlossenes Beutelsystem mit einer Stabilisatorlösung überführt [122]. Die meist eingesetzte CPD-Stabilisatorlösung besteht aus den Komponenten Citrat, Phosphat und Dextrose. Das Citrat wirkt antikoagulierend, die Phosphatverbindung verhindert das Absinken des pH-Wertes, das durch die anaerobe Glykolyse der Erythrozyten erfolgt und als Stoffwechselprodukt Milchsäure freisetzt. Die Dextrose wird zur Energiebereitstellung benötigt [122, 133].

Das Beutel-System besteht aus mehreren Einzelbeuteln, die über Schläuche verbunden sind, sodass eine keimfreie Auftrennung und Separation in die Lagerbeutel (EK und Plasma) möglich ist.

Wird bei der Herstellung auf das TK verzichtet, findet die Leukozytenfiltration vor der Zentrifugation der Vollblutspende statt. Hierbei bleibt ein Großteil der Thrombozyten im Filter hängen. Nach Zentrifugation wird das Plasma von der EK-Komponente abgetrennt.

Die Herstellung der Komponenten Plasma, EK und TK aus Vollblut erfolgt im ersten Schritt durch Zentrifugation. Die Blutkomponenten werden nach ihrem spezifischen Gewicht aufgetrennt [134].

Während des Zentrifugationsvorgangs wird die Zellsedimentation zunächst vom Zellradius bestimmt, d.h. die Leukozyten erreichen als erste den Beutelboden. Durch die hohe Dichte der Erythrozyten werden die Leukozyten dann aber verdrängt und bilden den Buffy-Coat gemeinsam mit den sehr langsam sedimentierenden Thrombozyten in der Mittelschicht des Beutels. Dieses Phänomen wird nur bei 20°C erreicht [134, 135].

TABELLE 1-1: GEWICHT, GRÖÖE UND LEBENSDAUER DER BLUTZELLEN IM ÜBERBLICK

Blutbestandteile	spezifisches Gewicht	Größe der Blutzellen	Lebensdauer
Plasma	1,026g/ml	Gelöste Proteine	-
Thrombozyten	1,058g/ml	2-3,5µm; 0,5-0,8µm	5-10 d
Monozyten	1,062g/ml	bis 20 µm	1-3 d
Lymphozyten	1,070g/ml	Inaktiv 6-9 µm; aktiviert 9-15 µm	12 d bis Jahre
Granulozyten	1,082g/ml	10-17 µm	h bis wenige d
Erythrozyten	1,100g/ml	Ø 7-8 µm, 2,4 µm dick, Mitte 1 µm	120 d

[136] Größe: [137], Lebensdauer: [138, 139]

Anschließend werden die Komponenten EK und Plasma in die entsprechenden Beutel abgetrennt. Das Plasma wird innerhalb von 24 Stunden eingefroren. Um ein Thrombozytenkonzentrat (TK) herzustellen wird der im Vollblutbeutel verbliebene Buffy-Coat (BC=Trennschicht mit Leukozyten und Thrombozyten) mit drei bis vier anderen blutgruppenidentischen Buffy-Coats aus anderen Vollblutspenden in einem Beutel unter Zugaben von Thrombozyten-Lagerlösung oder Plasma vereinigt, zentrifugiert und abgepresst.

TABELLE 1-2: LAGERUNG UND HALTBARKEIT VON BLUTKOMPONENTEN IM ÜBERBLICK

	EK	Pool-TK	Plasma
<i>Gehalt an Blutzellen</i>		>2x 10 ¹¹ /Einheit	k.A.
Lagerung	4°C ±2°C	22°C ±2°C unter Agitation	-30 bis -40°C (tiefgefroren), +2 bis 25°C (lyophilisiert)
Haltbarkeit	28-49 d	4x 24h ab Mitternacht des Entnahmetags	2-3 a
Volumen	Ca. 300 ml	260-360 ml	220-360 ml
Restleukozyten	< 1x 10 ⁶ Leukozyten/EK	<1x 10 ⁶ Leukozyten/TK	<0,1x 10 ⁹ /l

Quelle: [122, 133, 135]

Nach der Herstellung der zellhaltigen Komponenten findet eine Reduktion der Leukozyten durch Filtration statt. Diese Abreicherung wird vor der Lagerung der Blutkomponenten durchgeführt und soll unerwünschte Nebenwirkungen vermeiden. Dazu gehören febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen, Alloimmunisierung gegen HLA-Antigene, Immunsuppression des Empfängers, die Graft-versus-Host-Krankheit und die Übertragung von leukozytenständigen Erregern von Viren, aber auch von *Yersinia enterocolitica* [133, 140–142].

1.3.1 ERYTHROZYTENKONZENTRAT (EK)

Die Filtration von EKs erfolgt nach den ‚Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten‘ der Bundesärztekammer (BÄK) und kann an unterschiedlichen Stellen im Herstellungsprozess durchgeführt werden:

- a) Das Vollblut wird vor der Zentrifugation filtriert. Der Filter hält Leukozyten und Thrombozyten zurück. Nach Zentrifugation und Separation erhält man ein leukozytendepletiertes EK und ein Gefrorenes Frischplasma.
- b) Das Vollblut wird zentrifugiert, Plasma und Buffy-Coat (zur TK-Gewinnung) werden abgetrennt und das EK wird über einen Leukozytenfilter gegeben.
- c) Apheresepräparate werden entweder während der Herstellung oder nach der Blutgewinnung filtriert.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde zur Herstellung der EK-Komponenten ausschließlich nach Methode b) gearbeitet.

Dazu wird das EK nach der Zentrifugation in einen Zwischenlagerbeutel gepresst, der mit einem Leukozytenfilter und dem Lagerbeutel verbunden ist. Das Erythrozytenkonzentrat wird mit Hilfe der Schwerkraft durch Aufhängen von Leukozyten befreit und im Lagerbeutel (mit Additivlösung) bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt [142, 143]. Die Additivlösung (z.B. SAG-M, PAGGS-M) enthält Glukose als Nährstoff für die Erythrozyten, Mannitol zur Reduktion der Hämolyse-Rate und Adenin zur ATP-Produktion. Sie werden zur Verlängerung der Haltbarkeit und Erhalt der Qualität der Erythrozyten eingesetzt.

Die Haltbarkeit der Präparate beträgt 28 bis 49 Tage je nach Verfahren nach den Angaben des Herstellers. Die Lagerungstemperatur ist bei $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ definiert [133].

Auch kryokonservierte, gewaschene und bestrahlte EK werden für spezielle Indikationen hergestellt [122, 135], die bedingt durch die geringen Produktionszahlen und die Art der Herstellung in dieser Arbeit nicht weiter erwähnt werden.

Additivlösungen werden seit Mitte der 80er Jahre verwendet. Deutlich vor der Einführung der Leukozytendepletion (s. Kapitel 1.5) nahm die Häufigkeit von Transfusionszwischenfällen durch mit *Yersinia enterocolitica* kontaminierte EKs zu [85]. Der Verdünnungseffekt des Plasmas durch die Additivlösung könnte die Wachstumsbedingungen von *Yersinia enterocolitica* verbessert haben. Experimente der Arbeitsgruppe Gibb konnten zeigen, dass sich das Bakterium in 20%igem Plasma vermehren konnte [144]. Allerdings fanden die Experimente nicht in EK-Komponenten statt, in denen andere Umgebungsbedingungen herrschen als in mit Additivlösung verdünntem Plasma.

1.3.2 THROMBOZYTENKONZENTRAT (TK)

Leukozytendepletierte Pool-TK werden im geschlossenen System aus vier bis sechs Buffy coats oder fertigen Einzelspender-TK zusammengeführt und anschließend durch Filtration von den Leukozyten befreit. Das kleine Zellvolumen der Thrombozyten ermöglicht die Trennung von den anderen Blutzellen bei niedrigen Umdrehungszahlen und kurzer Laufzeit [122, 133]. Die bei der Zentrifugation entstehende obere thrombozytenhaltige Schicht wird über einen Leukozytenfilter in einen TK-Lagerbeutel abgepresst und bei 22°C ±2°C unter Agitation gelagert [135]. Einige Blutspendedienste verwenden zur Lagerung der TKs Plasmaersatzlösung, um die Qualität der Thrombozyten zu erhalten [145].

Apherese-TK werden im Anschluss an die Gewinnung leukozytendepletiert oder direkt während der Separation filtriert. Die Lagertemperatur beträgt +22°C ±2°C bei ständiger Agitation. Die Dauer ist mit 4 Tagen (4 x 24 h) angegeben, gerechnet ab 24:00 Uhr des Entnahmetages. Für gammabestrahlte TKs gelten dieselben Lagerbedingungen wie für nicht bestrahlte Ausgangspräparate. Von dieser Regel sind pathogeninaktivierte Thrombozytenkonzentrate ausgenommen. Sie dürfen bis maximal 5 Tage nach der Spende verwendet werden [122, 146].

1.3.3 GEFRORENES FRISCHPLASMA (GFP)

Die Plasmakomponente entsteht im ersten Schritt der Separation von Vollblut nach der Zentrifugation durch Abpressen der einzelnen Schichten in den im Beutelsystem integrierten Lagerbeutel. Das Plasma wird bei -40°C schockgefroren und dann bei -30°C gelagert. Nach einer Quarantänezeit von 4 Monaten

muss der Spender erneut auf virologische Infektionsparameter getestet werden, damit das Plasma zur Spende freigegeben werden kann [135].

1.4 ANTIMIKROBIELLE EIGENSCHAFTEN DES BLUTES

Zur Abwehr von Mikroorganismen besitzt das Immunsystem zwei verschiedene effektive Mechanismen, die sich gegenseitig in einer konzertierten Aktion ergänzen, die antigenunabhängige angeborene Immunität und die spezifische, gegen bestimmte Fremdstrukturen gerichtete Abwehr [147, 148].

Bei Erstinfektion mit *Yersinia enterocolitica* werden die Komponenten der unspezifischen Abwehr (humorale und zelluläre Antwort) aktiviert [29, 147–149]. Sie arbeiten antigenunspezifisch und sorgen dafür, dass der Wirtsorganismus bei einem Zweitkontakt schnell auf den Erreger reagieren kann [29, 147–150].

Im fortgeschrittenen Stadium der Infektabwehr oder bei Zweitkontakt mit dem Antigen übernimmt die adaptive, also die durch den Erstkontakt gebildeten Immunzellen die Hauptaufgabe. Dazu muss es mit antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt getreten sein und Gedächtniszellen gebildet haben, bevor es Antigene erkennen und eliminieren kann. Hierzu gehören die B- und T-Lymphozyten. B-Zellen sind die Träger der spezifischen humoralen Immunität. Sie besitzen Antikörper gegen spezifische Antigene auf ihrer Oberfläche und bilden bei Kontakt Plasmazellen, die dann vermehrt diese Antikörper nachproduzieren. Die T-Zellen gehören zur zellulären Abwehr und lassen sich in verschiedene Effektorzelltypen differenzieren, die wiederum unterschiedliche Funktionen ausüben. Sie binden an infizierte antigenpräsentierende Zellen und aktivieren durch Zytokinausschüttung die B-Zellen, Makrophagen und Neutrophile. Sie stimulieren zytotoxische T-Zellen, die apoptotisch auf virusinfizierte Zellen, intrazelluläre Bakterien und Tumorzellen wirken. Auch sind sie an einer kontrollierten Stimulierung und Beendigung der Immunantwort beteiligt [139, 150].

Die humorale Abwehr wird durch das Komplementsystem bereitgestellt, ein System aus über 20 Serumproteinen, die in ihren Vorstufen im Blutplasma zirkulieren. Es reagiert einerseits mit an Antigene gebundenen Antikörpern auf dem klassischen Weg und gehört somit zur adaptiv-humoralen Immunantwort. Eine weitere und schnellere Aktivierung erfolgt durch den alternativen Weg über die Bindung des Proteins C3b an die Oberflächenstruktur eines Mikroorganismus, der PAMPs (pathogen associated molecular patterns), wie zum Beispiel dem LPS von *Yersinia enterocolitica*. Dies löst eine Signaltransduktionskaskade aus, die dann zur Opsonierung und zum Lysieren des Erregers führt. Gramnegative Bakterien können durch den gebildeten Membran-Angriffs-Komplex (MAC) lysiert werden,

die Mureinschicht der grampositiven Bakterien allerdings schützt die zytoplasmatische Membran vor Perforierung durch MAC. Grampositive Erreger werden durch Opsonierung von C3b (Komplement) durch Phagozytose eliminiert [136, 143, 147, 148, 150, 151]. Der Faktor C3b des Komplementsystems wird im Plasma dauerhaft gebildet. Kann sich C3b nicht an PAMPs anlagern und bleibt frei, wird es von Faktor H gebunden und von Faktor I inaktiviert. Dieses Kontrollsystem verhindert die Anhäufung von C3b.

Die zellulären Komponenten der unspezifischen Abwehr werden aus Leukozyten rekrutiert und bestehen aus Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen. Sie eliminieren die Mikroorganismen durch Phagozytose. Die Rekrutierung der phagozytierenden Zellen in das infizierte Gewebe wird durch Chemokine (lösliche Lockstoffe) vermittelt. Die Opsonierung der Fremdkörper erfolgt durch Antikörper bzw. durch das Komplement [148, 150].

Neutrophile polymorphkernige Granulozyten (auch PMN oder Neutrophile genannt) sind 12-15 µm groß und haben nach ihrer Reifung im Gewebe eine Lebensdauer von 2 bis 3 Tagen. Sie zirkulieren im Blut und wandern bei Infektion in das geschädigte Gewebe ein. Bei einer Infektion (durch Freisetzung am Infektionsort) wandern sie zur Infektionsstelle und phagozytieren den Erreger. Ohne Kontakt mit Infektionen werden sie nach einigen Stunden (6-8h) apoptotisch und durch Makrophagen abgebaut.

Monozyten sind im Gegensatz zu den PMN mit 50-70% nur mit 2-6% an der Anzahl der Leukozyten vertreten. Nach der Bildung im Knochenmark zirkulieren Monozyten wenige Stunden bis Tage in der Blutbahn, bevor sie ins Gewebe wandern und dort zu Makrophagen ausreifen. Sie bilden zusammen das Monozyten-Makrophagen-System (MMS). Mit 20 µm sind sie etwas größer als die Neutrophilen und können Monate bis Jahre im Gewebe überleben. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose und Abtötung, aber auch die Präsentation von Antigenen. Sie sezernieren Zytokine, um die Zellen der adaptiven Immunabwehr zu stimulieren [139, 150].

Auch die dendritischen Zellen sind zur Antigenpräsentation befähigt. Sie bilden Verästelungen im Gewebe aus. Sie überwachen das Gewebe durch die ständige Aufnahme von Substanzen aus ihrer Umgebung und aktivieren das Immunsystem aufgrund von peripheren Signalen. Mikrobielle Strukturen werden von dendritischen Zellen identifiziert und Zytokine ausgeschüttet. Sie nehmen den Erreger durch Phagozytose auf und wandern zu den Lymphknoten, wo sie den dort befindlichen T-Zellen die antigenen Strukturen präsentieren. So spielen sie eine zentrale Rolle in der Verbindung der beiden Immunabwehrmechanismen [58, 150, 152].

Enteropathogene *Yersinia enterocolitica*-Stämme besitzen Mechanismen um die Immunantwort zu deaktivieren. Das plasmidkodierte Membranprotein YadA bindet Faktor H des Komplementsystems, der

sich an C3b anlagert. C3b wird durch Faktor I inaktiviert, was die Komplementkaskade deaktiviert [153]. Neueste Studien zeigen, dass YadA auch C3b bzw. die inaktivierte Form von C3b bindet und so die Bildung von Faktor H fördert. Faktor H lagert sich wiederum an C3b an und lässt somit weitere inaktivierte Proteine entstehen, die die Komplementaktivierung des alternativen Wegs hemmen [39].

Um die Zellen der unspezifischen Immunabwehr auszuschalten, werden von *Y. enterocolitica* Effektorproteine (Yops) über das Type Three Secretion System (TTSS) in die Wirtszellen geleitet, die dort die Signalauslösung zur Erkennung von „Fremd“ hemmen [65, 90]. Ob dieser Mechanismus zur Beseitigung der Bakterien in Blut beiträgt, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden [85, 143]. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass immunkompetente Zellen keinen Effekt auf das plötzliche Verschwinden der Bakterien in initial kontaminiertem (frischem vs. 2-Wochen altem) Blut hatten [85]. Dies deutet darauf hin, dass das Komplement oder eine andere Plasmakomponente für die Eliminierung der Bakterien im Blut verantwortlich gewesen sein könnten. Die Leukozyten hatten keinen Einfluss auf das Verschwinden des Erregers [85].

In Kontaminationsstudien mit *Yersinia enterocolitica* konnte beobachtet werden, dass sich Bakterienzellen in frisch beimpften Blut nicht mehr wiederfinden lassen [85]. Erst nach einer lag-Phase von 7 bis 10 Tagen wurde bakterielles Wachstum nachgewiesen. Die Überlebenschancen der Bakterienzellen (Inokula von 5 bis 10 KBE/ml Blut) bei sofortiger Lagerung nach Kontamination bei 4°C waren größer als mit 24 Stunden Vorinkubation bei 20°C [85, 154].

Es wurde vermutet, dass sich *Yersinia enterocolitica* in Phagozyten vermehren kann. Ob diese Fähigkeit nur zu Beginn der Infektion oder auch später im Blut noch vorhanden ist, wurde nicht beschrieben. Die Invasion in die Fresszellen durch virulente *Yersinia enterocolitica*-Zellen wird durch die plasmidkodierte Yops vermittelt, die das spezialisierte Sekretionssystem TTSS rekrutieren. Allerdings werden enteropathogene *Yersinia* als vornehmlich extrazellulär ständige Bakterien beschrieben. Ob und wie *Yersinia enterocolitica* in Makrophagen eindringt, muss noch untersucht werden [28, 48, 90, 149, 155].

Auch Thrombozyten können antimikrobiell wirksam sein. Kraemer et al konnte zeigen, dass aktivierte Plättchen *S. aureus* abgegrenzt und Cluster gebildet haben, sodass das Bakterium in seiner Proliferation beeinträchtigt wurde. Die Blutplättchen setzen ein Defensin frei, das für die Hemmung des Wachstums von *S. aureus* verantwortlich gemacht werden kann [Kraemer 2011].

1.5 LEUKOZYTENFILTRATION (LF)

Seit dem 01.10.2001 dürfen in Deutschland ausschließlich Vollblute, Erythrozytenkonzentrate und Thrombozytenkonzentrate in Verkehr gebracht werden, deren Gehalt weniger als 1×10^6 Leukozyten pro Transfusionseinheit beträgt (10% der hergestellten Komponenten dürfen mit 1×10^7 Leukozyten/ Einheit abgegeben werden) [122, 156]. Auch in anderen europäischen Ländern (Großbritannien, Frankreich, Niederlande, Portugal) und in Kanada und Neuseeland ist die Leukozyten-Depletion eingeführt worden (s. **Tabelle 1-3**). In USA ist die Durchführung optional und wird aufgrund ökonomischer Gesichtspunkte indikationsbezogen durchgeführt [157–160].

Übertragungen von *Yersinia enterocolitica* durch die Verwendung von leukozytendepletierten EKs sind in Deutschland stark zurückgegangen. Seit der Einführung wurde keine tödliche transfusionsbedingten bakteriellen Infektionen mehr bekannt, an der *Yersinia enterocolitica* beteiligt war. Im Jahr 2007 wurde ein Fall einer Übertragung durch ein kontaminiertes EK an das Paul-Ehrlich-Institut gemeldet, bei dem der Patient rekonvaleszierte [161]. Davor waren es drei fatal endende Fälle in den Jahren 1995, 1997 und 1998 [162, 163].

In welchem Maße die Leukozyten-Depletion an der Absenkung der Übertragungen von *Yersinia enterocolitica* durch Blutkomponenten beteiligt ist, scheint noch unklar zu sein. In einigen Studien, in denen Blut artifiziell kontaminiert wurde, konnte die Effektivität der Filter zur Verminderung dieser Bakterienspezies gezeigt werden [155]. Publierte Fälle nach Einführung sind selten. Ob die Übertragungen in anderen Ländern zurückgegangen sind, ist unklar. Aufgrund der Hämovigilanz-Daten des Paul-Ehrlich-Instituts kann diese Aussage für Deutschland getroffen werden (s. **Tabelle 1-3**). Bassuni veröffentlichte in seinem Review ‚Universal Leukoreduction‘ die Anzahl der in Frankreich gemeldeten bakteriellen Transfusionsreaktionen mit EKs 18 Monate vor und nach Einführung der Maßnahme. Die Zahl fiel um 66% von 71 auf 24 Transfusionszwischenfälle. Inwiefern *Yersinia enterocolitica* daran beteiligt war, wurde nicht erwähnt [157].

In Italien kam es 2015 zu einem tödlichen Transfusionszwischenfall durch ein nicht filtriertes EK. In diesem Land ist die Leukozytendepletion optional geregelt [108].

In **Tabelle 1-3** sind die Länder aufgelistet, in denen die Leukozytendepletion eingeführt wurde und Fälle von Übertragungen publiziert worden sind. Aufgrund dieser Datenlage kann angenommen werden, dass transfusionsbedingte bakterielle Infektionen durch *Yersinia enterocolitica*, vor allem die fatalen Ausgänge zurückgegangen sind.

TABELLE 1-3: TRANSFUSIONSASSOZIIERTE ÜBERTRAGUNGEN VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA* VOR UND NACH EINFÜHRUNG DER LEUKODEPLETION

Land	vorher		Leukodepletion seit	nachher	
	fatal	rekonvaleszent		fatal	rekonvaleszent
Frankreich	1982, 1988, 1989 (3x), 1992, 2005	1988	04/1998	2005	1993, 2005
Kanada	1985		07/1999		
Österreich		1994	01/1999		
Großbritannien	1993, 1994	1988, 1996	10/1999 ¹ 08/1999 ²		
Spanien/Portugal	1986		05/2001		
Neuseeland	1989, 1991, 1992- 1997 (4x)	1991	07/2001		2008, 2010
Deutschland	1995, 1997, 1998, 2001?	1990, 2000	10/2001		2007
Katar			01/2002		
Niederlande		1975	01/2002		2007, 2009
Norwegen	1984		01/2002		

*Zwischen 1997 und 2010 wurden 4 Fälle einer Übertragung von *Yersinia enterocolitica* durch EK an das Paul-Ehrlich-Institut gemeldet. Zwei davon endeten tödlich, zwei Patienten rekonvaleszierten. ?= das Jahr der Publikation [83, 156, 157, 160–162, 164–168], [169, 170] 1=England, 2= Wales und Schottland.

Auch in den folgenden Ländern wurde die Leukozytendepletion eingeführt: Luxemburg (12/1998), Irland (01/1999), Schweiz (09/1999), Nord-Irland (10/1999), Malta (01/2001), Vereinigte Arabische Emirate (07/2001), Katar (01/2002), Finnland (11/2002) und Australien (wahrscheinlich 10/2004) [160, 171].

Zur Filtration der Blutkomponenten werden i.d.R. Tiefenfilter mit unterschiedlichen Porengrößen zwischen 10 und 50µm eingesetzt, die über mechanische und adhäsive Eigenschaften eine Abreicherung von Leukozyten erreichen [172]. Sie bestehen aus mehreren Schichten nicht gewebten Fasern aus Polyester oder Polyurethan. Zur Erhöhung der Filtrationsleistung werden die Fasern ionisiert und chemisch vorbehandelt. Ihre Effektivität hängt von den physikochemischen Eigenschaften des Filtertyps und der

Zusammensetzung der Blutkomponente ab. Eine Reduktion der Leukozyten bis zu 5 log-Stufen wird erreicht [133]. Eine für die Vorgaben der Richtlinien „Hämotherapie“ hinreichende Leukozytenfiltration findet durch einmaliges Passieren des Blutes durch den Filter statt, der ein Bestandteil des geschlossenen Beutelsystems ist. Die Leukozytendepletion ist prinzipiell vor oder nach der Zentrifugation möglich und schließt sich auch an die Apherese an. Der genaue Wirkmechanismus der Retention ist bisher nicht gekannt, wird aber sowohl durch mechanische und biochemische Prozesse hervorgerufen [173].

Die Entfernung der Leukozyten sollte erst 6 bis 24 Stunden nach der Blutentnahme bei Raumtemperatur erfolgen, um möglichen Mikroorganismen die Anlagerung oder das Eindringen in bzw. die Beseitigung durch die phagozytierenden Zellen des Blutes zu ermöglichen. Insbesondere für *Yersinia enterocolitica* wurden systematische Untersuchungen mit unterschiedlichen Temperaturen und Inkubationszeiten durchgeführt. Bei einer Vorinkubation von drei Stunden bei 20°C war die Abreicherung der inokulierten Bakterienzellen am effektivsten [96, 157].

Verschiedene Autoren vermuteten, dass durch diese Maßnahme nicht nur ein Großteil an Leukozyten, sondern auch *Yersinia enterocolitica* aus dem Blut eliminiert werde. Allerdings wurde die vermutete Reduktion der Bakterienzellen durch die Filtration von Blut bisher nur in Experimenten beschrieben, die nicht die Bedingungen im Spenderblut wiedergespiegelt haben [105, 174, 175]. Dazu wurden mehrere Hypothesen aufgestellt [154]:

- *Yersinia enterocolitica* befindet sich in phagozytierenden Zellen und wird dadurch im Filter zurückgehalten [48, 174].
- Die Bakterien adhärieren an den Leukozyten entweder direkt oder durch mit C3b oder antikörpermarkierte Bakterien und werden deshalb zurückgehalten. Auch andere Proteine könnten diesen Vorgang triggern [154, 176].
- *Yersinia enterocolitica* bindet direkt an Leukozytenfilter aufgrund der Oberflächenladung, hydrophober Eigenschaften, mechanischen Kräften oder durch biologische Eigenschaften [154, 177, 178].
- Komplement inaktiviert die Bakterienzellen, verbessert das Adhäsionsverhalten der Bakterien zum Filtermaterial oder die Bakterien werden durch das Filtrieren abgetötet [143, 179, 180].

Es wird ein Einfluss der Plasmaproteine auf die Filtrationsleistung beschrieben. Versuche mit EKf und Albumin zeigten eine geringere Reduktion von Bakterien im Gegensatz zu Saline bzw. Additivlösung [154, 179, 180]. AuBuchon beschreibt in seinen Experimenten die 100%ige Reduktion von *Yersinia enterocolitica*

(Initialkeimzahl 25 KBE/ml) in EK durch Leukozytenfiltration, wohingegen die gleiche Menge an Bakterienzellen in einer 5%igen Albuminlösung keine Abreicherung durch die Filtration erbrachte [105].

Viele Ergebnisse sprechen dafür, dass die Reduktion von *Y. enterocolitica* vor allem durch das Komplement im direkten Kontakt zu den Bakterien vermittelt wird (komplementvermitteltes Abtöten). Obwohl *Yersinia enterocolitica* Abwehrmechanismen besitzt, scheint temperaturabhängig eine Eliminierung bzw. Reduktion durch Plasmaproteine des Komplements möglich zu sein [154].

Die Anheftung der Bakterienzellen an Leukozyten und deren Eliminierung durch die Filtration scheint plausibel. Aber auch die Beseitigung der Bakterien durch die hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Filtermaterial ist wahrscheinlich [83, 105, 154].

Extrazellulär überlebende *Y. enterocolitica* müssen sich vor dem Komplement schützen um im Blut überleben zu können. Innerhalb von Leukozyten oder anderen Körperzellen sind sie geschützt.

Diese Spezies wird als fakultativ intrazellulär beschrieben, lebt aber hauptsächlich extrazellulär [48, 90].

Es wurden viele Studien zur Effektivität der Abreicherung von *Yersinia enterocolitica* durch Leukozytenreduktion durchgeführt [85, 96, 105, 143, 157, 181, 181]. Da die Vorgehensweise zur Herstellung von Blutkomponenten in den verschiedenen Ländern unterschiedlich ist, unterscheiden sich auch die geprüften Parameter (Vollblut/EK, Initialkeimzahl, Temperatur und Zeitspanne der Vorinkubation, Überprüfung der Virulenz der eingesetzten Stämme, unterschiedliche Serotypen, Probenahmezeitpunkte).

1.6 TRANSFUSIONSBEDINGTE BAKTERIELLE INFEKTIONEN (TBBI)

Transfusionsbedingte bakterielle Infektionen sind nach dem erfolgreich eingeführten Viren-Screening für HIV, HBV, HCV nun die häufigsten durch Blut übertragenen Infektionen [83]. Damit eine TBBI gesichert ist, muss der Erreger sowohl in der transfundierten Blutkomponente als auch im Empfängerblut nachgewiesen werden [182].

Bakterien, die durch das Blut des Spenders oder während der Spende in den Beutel gelangen, sind durch eine geringe Anfangskeimzahl erst nach einer Latenzzeit im Blut nachweisbar und bleiben deshalb oft unerkant. Erst nach einer längeren lag-Phase können sie detektiert werden. Durch die Gabe dieser hoch kontaminierten Komponenten verursachen die Bakterien schwerwiegende Transfusionszwischenfälle, die bis zum Tod des Patienten führen können [8, 100, 104]. Das Anfang der Jahrtausendwende eingeführte „predonation sampling“ kann zwar die durch Punktion der Haut eingebrachten Keime weitgehend

verhindern. Endogene Erreger, wie zum Beispiel *Yersinia enterocolitica*, die sich schon vor der Spende im Blut befanden, können allerdings nicht eliminiert werden.

Da der Eintrag der Mikroorganismen bei einer Transfusion intravenös erfolgt, wird die überwiegende Mehrzahl von Abwehrbarrieren (Haut, Magen, Darm) umgangen. Deshalb ist die Virulenz der Bakterien sekundär um einen Zwischenfall auszulösen [183]. Der Erreger muss sich gegen die natürlichen Abwehrmechanismen des Spender- und Empfängerblutes zur Wehr setzen können. Klinisch relevant sind die Stämme, die im Blut vermehrungsfähig sind und dadurch zum Transfusionszwischenfall führen können [111, 184].

Der Grad der bakteriellen Transfusionsreaktion hängt von der Virulenz und der Anzahl der transfundierten Bakterien ab. Besonders gramnegative Bakterien, aber auch hohe Keimzahlen ($\geq 10^5$ KBE/ml) von weniger virulenten Bakterien in der Transfusionseinheit sind für das Auftreten und die Schwere der Transfusionsreaktion verantwortlich [185]. Abhängig von der Blutkomponente und deren Lagerung werden unterschiedliche Bakterienspezies gefunden [183].

1.6.1 TRANSFUSIONSBEDINGTE BAKTERIELLE INFESTIONEN DURCH THROMBOZYTENKONZENTRATE

Das Erregerspektrum von kontaminierten TKs besteht meist aus Kommensalen der Haut. Nach einer Adaptionsphase von zwei bis drei Tagen Lagerzeit können vermehrungsfähige Bakterien im TK sehr hohe Keimzahlen erreichen. Dadurch sind die Verläufe trotz der normalerweise geringen Pathogenität der residenten und transienten Hautbakterien schwerwiegend [183, 186].

Von den gefundenen Stämmen sind 56% grampositiv, die meisten davon aerob. Die Mehrheit der tödlich verlaufenden Zwischenfälle (60%) in TK ist durch gramnegative Bakterien induziert. Das Alter der transfundierten TKs liegt bei einer TBBI in der Regel am Ende der Haltbarkeit [186–190]. Deshalb wurde die maximale Haltbarkeitsfrist von fünf Tagen auf vier Tage ab Mitternacht des Entnahmetages verkürzt (Votum 38 des Arbeitskreises Blut) [146, 191].

In der Literatur wurden erst zwei Transfusionszwischenfälle beschrieben, die auf mit *Yersinia enterocolitica* kontaminierte TKs zurückzuführen waren. Die Patienten konnten in beiden Fällen wiederhergestellt werden. Die Gaben der assoziierte EK Komponenten verliefen dagegen tödlich [8, 192, 193].

1.6.2 TRANSFUSIONSBEDINGTE BAKTERIELLE INFESTIONEN DURCH PLASMA

Da Plasma nach der Herstellung eingefroren und erst kurz vor Gabe wieder aufgetaut wird, geht von dieser Komponente ein vergleichsweise niedriges Risiko einer Übertragung aus. Aufgrund der Lagerungstemperatur bei -30°C , den Quarantänelagerungsbedingungen und des hohen Gehaltes an Komplement bietet es den Mikroorganismen wenig Gelegenheit sich zu vermehren. Einzelne Fälle wurden in Verbindung mit dem Auftauvorgang im kontaminierten Wasserbad und einer verlängerten Zeitperiode nach dem Auftauen bis zur Transfusion beschrieben [183, 194]. Der Hämovigilanz-Bericht von 2013-2014 dokumentiert fünf Fälle von bakteriell kontaminierten GFP zwischen 1997 und 2010, bei denen es zu Zwischenfällen mit nicht fatalem Ausgang gekommen ist [182]. *Yersinia enterocolitica* wurde bisher noch in keiner Plasmakomponente gefunden, obwohl durch die Zentrifugation bei der Herstellung nicht alle Bakterien aus einer kontaminierten Vollblutspende eliminiert werden können [8, 183].

1.6.3 TRANSFUSIONSBEDINGTE BAKTERIELLE INFESTIONEN DURCH ERYTHROZYTENKONZENTRATE

Erythrozytenkonzentrate sind die am häufigsten transfundierten Blutkomponenten [83]. In den Jahren 2013 und 2014 wurden in Deutschland ca. 7,75 Millionen EKs verbraucht. Innerhalb dieser Zeit wurden fünf bestätigte nicht fatale Transfusionsreaktionen gemeldet. In zusätzlich neun Verdachtsfälle waren EKs involviert [182].

Hauptsächlich werden gramnegative Bakterien (vor allem *Enterobacteriaceae*) in kontaminierten EKs gefunden. Die Lagertemperatur von Erythrozytenkonzentraten schränkt die Auswahl der kontaminierenden Bakterienspezies stark ein. Psychrophile Bakterien können unter diesen Bedingungen jedoch überleben und sich vermehren. Die Adaptionsphase beträgt ca. zwei bis drei Wochen. Im Verlauf der Lagerung bei 4°C können bis zu 10^{10} Kolonie bildende Einheiten (KBE) pro ml EK erreicht werden [8].

In Deutschland werden für EKs keine mikrobiologischen Kontrollen durchgeführt. In Kanada und Großbritannien gilt die „30 minute rule“. EKs dürfen danach nur eine halbe Stunde vor Transfusion bei Temperaturen über Lagertemperatur aufbewahrt werden, da sonst die Proliferation von Bakterien ermöglicht würde. Durch diese Einschränkung werden einige Komponenten verworfen. Kanada hat die Lagerzeit von EKs ohne Kühlung auf 60 Minuten erhöht, um diesem Problem zu entgegnen [195, 196]. *Yersinia enterocolitica* war bis zur Einführung der Leukozytendepletion der am meist gefundene Erreger in EKs weltweit [8, 83, 93, 183, 185, 194, 197, 198].

1.6.4 IN DEUTSCHLAND EINGEFÜHRTE PRÄVENTIVMAßNAHMEN

Präventivmaßnahmen sind Maßnahmen zur Vorbeugung von Krankheiten und gesundheitlichen Komplikationen. In diesem Zusammenhang sind dies Vorkehrungen, die getroffen werden um vor und während der Blutspende eine Kontamination des zu spendenden Blutes zu minimieren.

Neben dem Transfusionsgesetz (TFG) und den Richtlinien zur Hämotherapie, die die Grundlage für eine sichere und gesicherte Versorgung sowohl der Spender als auch Empfänger darstellen, gab es seit 1997 zusätzliche Bestrebungen zur Verbesserung der bakteriellen Sicherheit von Blutpräparaten in der Transfusionsmedizin für Hersteller und Anwender. Einige der eingeführten Maßnahmen sind für bereits im Spenderblut existierende Mikroorganismen nicht relevant. Folgende Punkte können das Risiko der Übertragung von *Yersinia enterocolitica* durch die Transfusion von EKs allerdings minimieren:

- Mit den ‚Mindestanforderungen zur Sterilitätstestung (Votum 16)‘ wurde eine Basis geschaffen, grundsätzliche Voraussetzungen für die Sterilitätstestung von Blutkomponenten (z.B. Anzahl der zu testenden Blutpräparate, Vereinheitlichung der Hygienemaßnahmen) in den Blutspendediensten zu etablieren. Dieser Bedarf wurde für die Hersteller und die Anwender von Blutprodukten durch die Verabschiedung des Votum V16 gedeckt. Weiterhin können durch die einheitlich gestaltete qualitätsgerechte Kontrolle, die in den Mindestanforderungen festgeschrieben ist und an denen sich die Blutspende-Einrichtungen orientieren, exakte Daten über die Kontaminationsraten der Blutkomponenten generiert werden. Zur Weiterentwicklung der Blutsicherheit sind diese Ergebnisse obligatorisch. Die Mindestanforderungen wurden im Jahr 2012 aktualisiert [199, 200].
- Der Zusatz in den Hämotherapie-Richtlinien zur Spenderauswahl, Spender auszuschließen, die innerhalb der letzten vier Wochen an einer Durchfallerkrankung unklarer Ursache erkrankt waren/sind [122].
- Die Einführung der Filtration von zellulären Blutpräparaten zur Verminderung der Leukozytenzahl und die dadurch stattfindenden Reduktion der Anzahl an Bakterienzellen von *Yersinia enterocolitica* [8, 154].

1.7 ZIEL DER ARBEIT

Transfusionsbedingte Reaktionen, ausgelöst durch *Yersinia enterocolitica*, kommen weltweit vor. Überwiegend sind bei der Übertragung kontaminierte Erythrozytenkonzentrate beteiligt. In Deutschland wurde seit einer Übertragung im Jahr 2007 kein weiterer Zwischenfall mehr an das Paul-Ehrlich-Institut gemeldet.

In dieser Arbeit sollte das Risiko einer Übertragung von *Yersinia enterocolitica*, Serotyp O:3 durch Blut herausgearbeitet werden. Dabei soll geklärt werden, in welchem Umfang die Präventionsmaßnahmen, insbesondere die Leukozytenfiltration einen Beitrag zur Vermeidung geleistet haben. *Yersinia enterocolitica*, Serotyp O:3 ist der am häufigsten vorkommende pathogene Serotyp in Deutschland und wurde deshalb für diese Arbeit ausgewählt.

Da das Plasmid nicht in jeder Zelle des von der DSMZ bezogenen Stammes vorlag, musste die Rate an plasmidhaltigen Bakterienzellen bestimmt werden, um eine definitive Aussage über die Virulenz zu erhalten. Es war erforderlich geeignete Kultivierungsbedingungen zu finden um das Plasmid in den Zellen zu erhalten. Mit dieser Kultur sollte eine plasmidhaltige Referenzkultur von *Yersinia enterocolitica* hergestellt werden um Aliquots für standardisierte Kontaminationen zu produzieren.

Zur Klärung der Frage, weshalb hauptsächlich Erythrozytenkonzentrate an den Transfusionsreaktionen mit *Yersinia enterocolitica* beteiligt sind, musste die Verteilung von *Yersinia enterocolitica* im aufgetrennten Vollblut und deren Überleben in den Komponenten evaluiert werden.

Um die Effektivität der Leukozytenfiltration bezüglich der Abreicherung der Bakterien in den Blutkomponenten zu überprüfen, sollten verschiedene Matrices und auch ein Referenzstamm ohne Plasmid zum Vergleich eingesetzt werden und die Retentionsraten der Bakterien im Leukozytenfilter bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit war es auch aufzuklären, inwiefern die zelluläre unspezifische Immunabwehr des Menschen bei der Eliminierung der *Yersinia enterocolitica* aus dem Blut eine Rolle spielt. Hierfür sollten Wachstumsversuche mit *Yersinia enterocolitica* in den verschiedenen Komponenten durchgeführt werden.

Um ein Risiko der Übertragung von *Yersinia enterocolitica* durch Blutkomponenten für die gegenwärtige Situation ableiten zu können, sollten auch epidemiologische Gesichtspunkte berücksichtigt und die bisher generierten Hämovigilanzdaten vor und nach Einführung der Leukozytenfiltration in die Risikoabschätzung miteinbezogen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MIKROORGANISMEN

TABELLE 2-1: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN MIKROORGANISMEN

PEI Nummer	Spezies	DSMZ Nummer, Spezifikation	Herstellungsdatum
PEI-A-101	<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 11502, plasmidhaltig	15.03.2005
PEI-A-102	<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 9676, plasmidlos	20.03.2003

Beide Bakterienstämme wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bestellt. Sie wurden aufgrund ihrer Herkunft und des Plasmidbesitzes ausgewählt. Beide Stämme gehören zur Risikogruppe 2.

DSM 11502 *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleartica* (Serovar O:3, Biotyp 4) ist ein klinisches Isolat und ist durch seinen Plasmidbesitz als virulent und pathogen einzustufen. Es wurde von Neubauer et al untersucht und beschrieben (Herkunftsland Deutschland) [201].

DSM 9676 *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleartica* (Serovar O:3, Biotyp 4) wurde aus mesenterischen Lymphknoten isoliert. Da dieser Stamm kein Plasmid aufweist, wurde er als Kontroll-Mikroorganismus eingesetzt. Neubauer et al hat diesen Stamm untersucht und beschrieben (Herkunftsland Schweden) [201].

Die Bakterienstämme wurden in die PEI-Stammsammlung aufgenommen. Die genauen Bezeichnungen sind in **Tabelle 2-1** aufgeführt. Vom plasmidhaltigen Stamm sind zwei Chargen produziert worden (PEI-A-101-01 und PEI-A-101-02), von der plasmidlosen Variante eine Charge (PEI-A-102).

2.2 KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN

Die Kultivierung der in **Tabelle 2-1** gelisteten Mikroorganismen erfolgte auf Festnährböden sowie in Flüssigmedien. Diese wurden zur Keimzahlbestimmung, Keimisolierung bzw. zur Anreicherung verwendet.

2.2.1 FEST- UND FLÜSSIGNÄHRMEDIEN

Zur Herstellung der Nährböden wurde Standard-I-Nähragar (in g/l: Pepton aus Casein 15,0; Hefeextrakt 3,0; Natriumchlorid 6,0; D(+)-Glucose 1,0; Agar-Agar 12,0) von MERCK, Darmstadt, Deutschland und Standard-I-Blutagar (siehe Zusammensetzung Standard-I-Agar, versetzt mit 5 % sterilem, defibriniertem Schafblut von ACILA, Mörfelden-Walldorf, Deutschland) verwendet.

Die Nährböden wurden in der Nährbodenküche des Paul-Ehrlich-Institutes (PEI) mit einem vollautomatischen Nährmediensterilisator (MediaClave von Integra, Fernwald, Deutschland) hergestellt und autoklaviert. Die Abfüllung der Agarplatten erfolgte vollautomatisch mit der Petri Swiss Abfülllinie Biomedis, Gießen, Deutschland.

Das Flüssig-Nährmedium, Soja-Casein-Pepton-Medium (TSB) wurde von heipha diagnostica, Heidelberg, Deutschland bezogen (die Nährmedien werden nun von MerckMillipore, Darmstadt vertrieben).

Für die Erhaltung des Plasmids wurde Caso-Bouillon mit Kalzium versetzt. Der Kalziumgehalt des Mediums wurde durch Zugabe von Kalziumchlorid (CaCl_2) erhöht. Dazu wurde Kalziumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, Pulver) von der Firma Fluka Biochemika (Buchs, Schweiz) verwendet. Das Pulver wurde abgewogen, in 0,85%iger Kochsalzlösung gelöst und anschließend steril filtriert. Die entstandene Stammlösung hatte eine Molarität von 8 mM. Zur Anwendung wurden 100 ml TSB-Medium mit 10 ml der Stammlösung versetzt, so dass sich eine Endkonzentration von 727 $\mu\text{mol/l}$ im Wachstumsmedium ergab.

2.2.2 KULTIVIERUNG IN AUTOMATISCHEN KULTURSYSTEMEN

2.2.2.1 Kultivierung im BacT/ALERT® 3D System

Zur Wachstumskontrolle von *Yersinia enterocolitica* wurde das BacT/ALERT® 3D Kultivierungssystem (BioMérieux, Nürtingen, Deutschland) verwendet. Beimpfte, speziell dafür entwickelte Kulturflaschen werden in einen Schüttel-Inkubator mit Reflexionsmessung eingestellt und alle 10 min auf Wachstum überprüft: Pro Zeiteinheit wird eine definierte Lichtmenge von einer Diode ausgesendet und die Reflexion gemessen. Die dafür vorgesehenen Kulturmedien sind am Flaschenboden mit einem Flüssigemulsionssensor versehen, der auf pH-Wert Änderungen reagiert. Durch die proportional zum Bakterienwachstum entstehenden Wasserstoffionen und der damit sinkende pH-Wert ändert sich die Farbe des Indikators. Daraus resultiert eine veränderte Reflexion des ausgesandten Lichts der Photodiode, die von der Messeinheit des BacT/ALERT detektiert wird. Durch vorgegebene Algorithmen wird die Probe nach einer bestimmten Zeit als positiv erkannt und ein Signal an die Computereinheit weiter gegeben.

Für den Nachweis von *Yersinia enterocolitica* kamen aerobe Kulturflaschen (SA und iAST, BioMérieux, Nürtingen, Deutschland) zum Einsatz, die bei 37°C für 14 Tage im BacT/ALERT® 3D inkubiert wurden. Zur mikrobiologischen Kontrolle von Blut wurden zusätzlich die anaeroben Medien (SN und iNST, BioMérieux, Nürtingen, Deutschland) verwendet. Hier fand eine Inkubation der aeroben Flaschen bei 20-25°C und der anaeroben Flaschen bei 30-35°C statt. Positive Kulturflaschen wurden nach Detektion des Bakterienwachstums entnommen und auf Reinkultur (Drei-Ösen-Ausstrich) auf Standard-I-Blutagar überprüft.



Abbildung 2-1: Indikatorboden der BacT/ALERT Kulturflaschen. Quelle: <http://www.biomerieux.de>

2.2.2.2 Kultivierung im BacTrac 4300

Das BacTrac 4300 Kultivierungssystem (Sy-Lab, Neupurkersdorf, Österreich) fand bei der Herstellung der Bakterien-Standards Einsatz. Die BacTrac-Messzellen (Fertigmesszellen 4 Elektroden, M+E Messung, SY-LAB, Neupurkersdorf, Österreich) wurden mit 10 ml Caso-Bouillon gefüllt und mit 100 µl Bakteriensuspension beimpft. Die vorbereiteten Messzellen wurden im BacTrac 4300 bei 37°C bis zum Erreichen des vorher definierten Erntezeitpunktes inkubiert.

Pro Ansatz wurden Positivkontrollen (BacTrac-Messzelle mit 10 ml Medium mit 100 µl der Bakteriensuspension) und Negativkontrollen (BacTrac-Messzelle mit 10 ml Medium ohne Zusatz) mitgeführt.

Der BacTrac4300 analysiert bakterielles Wachstum durch die Änderung der elektrischen Impedanz in Quantität und Qualität. Die Stoffwechselprodukte der eingebrachten Mikroorganismen verändern die Leitfähigkeit des Mediums in der Messzelle. Bakterien verstoffwechseln ungeladene oder schwach leitfähige Stoffe zu ihren Endprodukten, die eine stärkere Leitfähigkeit besitzen. Dies liegt an der Entstehung ionisierter Metabolite und auch an der verminderten Größe dieser Stoffwechselprodukte. Sie sind beweglicher und besitzen eine bessere Leitfähigkeit. Beim Anlegen einer Wechselspannung an die

Elektroden im leitfähigen System entsteht dann ein Stromfluss, der von dem Widerstand der Elektrolytlösung, der Elektrodenkapazität und der Frequenz des Stromkreises abhängt [202]. Dieser gesamte Wechselstromwiderstand wird als Impedanz bezeichnet.

Die Änderung der Impedanz, d.h. die veränderte Ionenkomposition wird durch Elektroden innerhalb der Messzelle in bestimmten Abständen detektiert und auf dem Bildschirm angezeigt.

Die angezeigten Kurven sind vergleichbar mit bakteriellen Wachstumskurven. In der initialen Phase des BacTrac4300 adaptieren sich die Bakterien an das Substrat und starten ihre exponentielle Wachstumsphase. In dieser Phase kann noch keine Reduktion von Substrat gemessen werden. Erst bei einer Zellzahl von 10^6 - 10^7 KBE/ml ist der Start der exponentiellen Phase der Detektionskurve erreicht.

Der Übergang zur stationären Phase resultiert aus der Limitierung eines Nährstoffs oder der Anreicherung an toxischen Stoffwechsel-Endprodukten [203, 204].

Während der M-Wert (Medienimpedanz) die Änderungen der Impedanz im flüssigen Medium selbst misst, zeichnet der E-Wert auch bei hohen Ionenkonzentrationen (Selektivmedien) Wachstumsänderungen auf. Der M-Wert detektiert die Ionenkomposition, wohingegen der E-Wert die Änderung der elektrochemischen Doppelschicht der Elektrode erfasst.

Die Darstellung erfolgt dabei in relativen Größen. So bedeutet die Änderung des Impedanz-Messwertes die relative Änderung der Abnahme der Impedanz bezogen auf den Anfangswert.

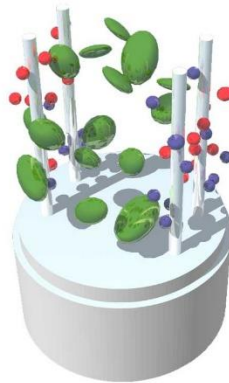


Abbildung 2-2: Boden einer BacTRac Messzelle mit 4 Elektroden. In grün dargestellt sind Mikroorganismen, in rot Substrate und in blau Produkte. Quelle: <http://microbiology.sylab.com>

2.3 BESTIMMUNG DER LEBENDZELLZAHL VON MIKROORGANISMEN

Zum Nachweis von bakteriellem Wachstum und zur quantitativen Bestimmung der Mikroorganismen wurde die konventionelle Keimzahlbestimmung mittels Spatelverfahren angewandt.

Unter der Keimzahl wird die gesamte Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten (KBE, Gesamtkeimzahl) einer bestimmten Spezies verstanden, die in einem definierten Volumen unter definierten Kulturbedingungen ermittelt wird. Die Keimzahlbestimmung erfolgte über das Anlegen einer dekadischen Verdünnungsreihe und Beimpfung von Agarplatten mittels Drigalski-Spatel.

Hierzu wurde 1 ml der Probe in 9 ml Verdünnungsmedium (NaCl 0,85%) überführt und eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt. Die Kochsalzlösung wurde hausintern von der Nährbodenküche hergestellt. Aus den letzten drei Verdünnungsstufen wurden je 100 µl auf drei Agarplatten aufgebracht und mit einem sterilen Einwegspatel gleichmäßig verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 24h-48h. Nach visueller Beurteilung der Bakterienkolonien wurden alle Agarplatten mit einer Koloniezahl zwischen 15 und 250 Kolonien pro Platte ausgezählt. Für jede Verdünnungsstufe wurde zunächst das arithmetische Mittel bestimmt. Daraus wurde dann die tatsächliche Keimzahl errechnet:

Arithmetisches Mittel einer Verdünnungsstufe:

$$N_v = \frac{c}{(n)d}$$

Arithmetisches Mittel der Ausgangskeimzahl:

$$N_{gesamt} = \frac{\sum N_v}{n_v}$$

N_v	Arithmetisches Mittel der Verdünnungsstufe
C	Gesamtanzahl der Kolonien auf allen Petrischalen
n	Gesamtanzahl der ausgewerteten Petrischalen
d	Verdünnung der ausgewerteten Zählung
n_v	Anzahl der ermittelten Mittelwerte der Verdünnungsstufen

2.4 STAMMHALTUNG

Zur Aufbewahrung der Isolate wurde eine Master-Bacteria-Bank (MBB) angelegt. Diese Konservierungsmethode erlaubt ein schnelles Nachproduzieren von Bakterien-Standards mit definierten

Keimzahlen. In den Cryoröhrchen des verwendeten Cryobank™-Stammhaltungs-Systems von Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland sind Trypticase-Soja-Bouillon (TSB-Medium) und 25 Keramikkügelchen enthalten. Zur Konservierung wurden die Stämme auf die Oberfläche der Kügelchen gebracht und bei -80°C tiefgefroren (Herstellung MBB).

Dazu wurden die Bakterien auf einer Standard-I-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nachdem die Kolonien in ausreichender Zahl und Größe (ca. 2 mm Durchmesser) gewachsen waren, wurden einige Kolonien mit einem sterilem Tupfer abgenommen und in ein Stammhaltungs-Kryoröhrchen überführt. Pro Stamm wurden insgesamt 6 Röhrchen MBB des Cryobank™-Stammhaltungs-Systems überimpft und bei -80°C gelagert.

Zur Charakterisierung und Überprüfung der eingefrorenen Mikroorganismen wurde ein Kügelchen über Nacht in 10 ml Caso-Bouillon (s. 2.2.1) bei 37°C inkubiert und im Anschluss daraus ein fraktionierter Ausstrich auf Standard-I-Agar angelegt. Zur Kontrolle fand eine Gramfärbung statt und die Identität wurde mit dem API-Test (s. 2.6.4) festgestellt.

Um schnell und unkompliziert Standards aus demselben Material herzustellen, wurden Stammsuspensionen (MBB+1) hergestellt und eingefroren, die bereits definierte Keimzahlen an Bakterien enthielten. Je eine dieser Ausgangskulturen wurde zur Herstellung einer neuen Charge an *Yersinia enterocolitica*-Standards verwendet.

2.5 HERSTELLUNG DER STANDARDS

Zur schnellen und unkomplizierten Anwendung wurden Bakterienstandards mit definierten Keimzahlen hergestellt. Diese waren durch die im Paul-Ehrlich-Institut etablierte Konservierung bei -80°C über Jahre in ihrer Keimzahl stabil.

Dazu wurden die ausgesuchten Stämme von *Yersinia enterocolitica* kultiviert, zu einem definierten Zeitpunkt geerntet, eingefroren und in aliquotierten Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert. Vor und nach dem Einfrieren wurde die Keimzahl bestimmt und über einen längeren Zeitraum Stabilitätskontrollen durchgeführt.

2.5.1 BESTIMMUNG DES OPTIMALEN ERNTEZEITPUNKTES

Zur Herstellung des Standards wurde der Erntezeitpunkt der Bakterien im BacTrac (s. 2.2.2.2) ermittelt. Ziel war es, die Ernte so zu legen, dass möglichst wenig tote Zellen und Zelldebris in den Bakterien-

Standards enthalten waren. Dazu wurden 20 BacTrac-Messzellen mit je 10 ml Caso-Medium gefüllt und mit 100 µl einer ausgewählten Verdünnungsstufe eines Bakterienstammes mittig mit einer Pipette beimpft. Die Messzellen wurden nach der Inokulation weder geschüttelt noch gestürzt. Die Inkubation erfolgte im BacTrac bei 37°C. Um eine definierte Aussage über die Keimzahl nach einer bestimmten Inkubationsdauer im BacTrac zu erhalten, wurden ab dem Zeitpunkt von 4 Stunden Vorinkubation stündlich je zwei Messzellen aus dem Inkubator genommen und daraus eine konventionelle Keimzahlbestimmung durchgeführt. Durch die parallelen Keimzahlbestimmungen konnte anhand der erfassten Impedanzkurve der Zeitpunkt der Beprobung den ermittelten Keimzahlen zugeordnet und eine Aussage über das tatsächliche Wachstum gemacht werden. Die Ernte erfolgte im Bereich zwischen ca. 10^6 und 10^7 KBE/ml nach einer definierten Inkubationszeit im BacTrac.

2.5.2 KULTIVIERUNG UND ERNTE

Die Bakteriensuspension zur Herstellung des Repository wurde mit Caso-Bouillon angesetzt. Für die Produktion der Bakterienstandards wurde eine ausreichende Anzahl an Messzellen mit 10 ml Caso-Bouillon gefüllt und mit je 100 µl der aus den Vorversuchen definierten Verdünnungsstufe einer Bakterienkultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Um zu gewährleisten, dass das Medium steril war, wurde es 24 Stunden vor Beginn abgefüllt, bei Raumtemperatur gelagert und am nächsten Tag auf Eintrübung kontrolliert. Zwei verbleibende BacTrac-Messzellen wurden als Medien-Kontrolle mitgeführt.

Nach Erreichen des festgelegten Schwellenwertes und unauffälligen Impedanzkurven wurden die Messzellen aus dem Gerät entnommen und in einem sterilen Becherglas vereinigt. In einem Verhältnis von 1:1 wurde 20%iges Humanalbumin hinzugegeben und die Mischung homogenisiert. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden. Je 1,5 ml der homogenisierten Suspension wurden mit einer Multipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in vorher etikettierte Kryogefäße mit einem Volumen von 1,5 ml (Nunc GmbH&Co.KG, Langenselbold, Deutschland) abgefüllt. Während der Abfüllung bzw. vor jedem Aufziehen der Multipette wurde die Suspension immer wieder sorgfältig durchmischt. Die aliquotierten Kryoröhrchen wurden im Anschluss direkt in Kryoboxen sortiert und bei -80°C eingefroren. Zur Feststellung der Keimzahl wurden Proben zurückgestellt. Eine Charge umfasste 81 Röhrchen à 1,5 ml.

Für die Experimente wurden zwei Chargen des plasmidpositiven Stammes (YEP+) produziert. Sie wurden mit der Endung -01 und 02 gekennzeichnet. Der Standard wurde nach Herstellung in die PEI interne Stammsammlung aufgenommen und wird als PEI-A-101 geführt. Die plasmidlose Variante (YEP-) ist als PEI-A-102 angelegt.

2.5.3 AUFTAUEN EINES STANDARDS

Die tiefgefrorenen Bakterien-Standards wurden unter definierten Bedingungen aufgetaut. Um die korrekte Keimzahl zu erhalten, fand die Verarbeitung direkt nach dem Auftauen des Standards statt. Dazu wurde ein Kryoröhrchen des jeweiligen Bakterienstammes direkt bei 37°C im Brutschrank für 10 min aufgetaut und kurz vor der Verwendung 10 s auf einem Vortexer gemischt.

2.5.4 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL EINER HERGESTELLTEN CHARGE

Mindestens 24 h nach dem Einfrieren wurde ein Standard aufgetaut und die Gesamtkeimzahl der Bakteriensuspension bestimmt (s. 2.3). Anhand der Keimzahlbestimmung vom Vortag wurde die Verdünnung bis zu einer Verdünnungsstufe weitergeführt, bei der mit einer Bakterienzahl zwischen 15 und 250 KBE pro 100 µl zu rechnen war. Diese Verdünnungsstufe wurde auf 3 Standard-I-Agar Platten ausgestrichen und bei 37°C 24 h bis 48 h inkubiert.

2.5.5 STABILITÄTSTESTUNG DER BAKTERIENZAHL

Zur Überprüfung der Bakterienzahl über eine längere Lagerperiode bei -80°C im Tiefkühlschrank wurden im Anschluss an die Bestimmung der Zellzahl innerhalb von drei Monaten zwei weitere Stabilitätskontrollen durchgeführt. Die Stabilitätstests wurden unregelmäßig weitergeführt und ergaben sich meist aus der Bestimmung der Initialkeimzahl der eingesetzten Inokula der beiden Stämme.

2.6 IDENTIFIZIERUNG VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Um sicher zu stellen, dass der eingesetzte Stamm kultiviert wurde, um mögliche Kontaminationen zu erkennen und die Differenzierung der virulenten Bakterienzellen vorzunehmen, wurden verschiedene Methoden verwendet.

2.6.1 MAKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG

Bei der Einschätzung mit bloßem Auge wurde die Koloniemorphologie kontrolliert. Einheitliche Koloniefarbe und -form gab Hinweise darauf, dass eine Reinkultur vorlag.

2.6.2 KULTURELLE DIFFERENZIERUNG VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

2.6.2.1 Vergleich der Zellpopulationen mit und ohne Plasmid in PEI-A-101-02

Die Koloniegröße des Stammes PEI-A-101-02 wurde auf Standard-I-Blutagar nach 24 h und 48 h überprüft. Nach 24 h waren große Kolonien schon eindeutig zu erkennen und wurden markiert. Nach 48 h waren alle Kolonien so groß, dass die Endablesung und die Auszählung durchgeführt werden konnte. Zur Bestimmung des Plasmidgehaltes anhand der Koloniegröße wurden die markierten Kolonien mit Einmal-Impfösen abgepickt und eine Plasmidbestimmung durchgeführt (s. 2.7).

2.6.2.2 Statistische Auswertung der beobachteten Häufigkeiten in PEI-A-101-02

Die statistische Auswertung wurde mit der Unterstützung des Biostatistikers Kay-Martin Hanschmann, Paul-Ehrlich-Institut, durchgeführt. Die Ergebnisse zur Feststellung des Plasmidgehaltes anhand der Koloniegröße wurden mit dem Exakten Test nach Fisher ausgewertet.

2.6.3 MIKROSKOPISCHE DIFFERENZIERUNG

Bakterienzellen wurden zur mikroskopischen Differenzierung entsprechend ihres Gram-Verhaltens charakteristisch mit der Gramfärbung angefärbt. Von einem fraktionierten Ausstrich auf Standard-I-Agar wurde eine vereinzelte Kolonie entnommen und in 100 µL NaCl (0,85%) suspendiert. Ein Objektträger wurde mit einer sterilen Impföse bestrichen und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zur Hitzefixierung wurde der Objektträger dreimal durch eine Bunsenbrenner-Flamme gezogen. In **Tabelle 2-2** sind die Färbeschritte dokumentiert:

TABELLE 2-2: FÄRBESCHRITTE DER GRAMFÄRBUNG

	Einwirkzeit	Behandlungsschritt
1	3 min	<u>Kristallviolett-Oxalat-Lösung</u> im Überschuss auf den OT auftragen, mit Lugolscher Lösung abspülen
2	2 min	mit <u>Lugolscher Lösung</u> überdecken, mit 90%igem Alkohol/Aceton Gemisch (3:1) entfärben, neutralisieren mit Aqua dest.
3	1 min	mit <u>Safranin-Lösung</u> gegenfärben, mit Aqua dest. waschen

Nach dem Trocknen wurde die mikroskopische Differenzierung mit dem Axioskop von ZEISS, Jena, Deutschland durchgeführt. Gramnegative Bakterien erschienen im Lichtfeld des Mikroskops rosarot (Abbildung 2-3), grampositive dagegen dunkelviolet bis blau. Zusätzlich wurde auch die Zellmorphologie der *Yersinia* Kulturen kritisch kontrolliert.

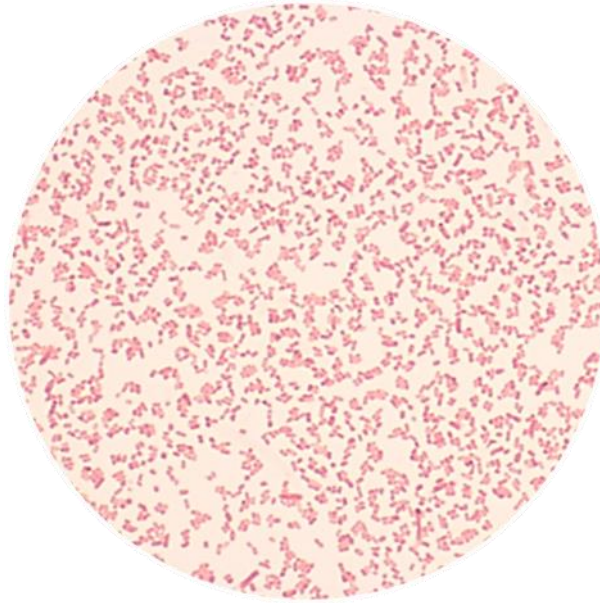


Abbildung 2-3: *Yersinia enterocolitica* im Grampräparat

2.6.4 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

Für die biochemische Charakterisierung kam der Analytischer-Profil-Index (API) Test von BioMérieux, Nürtingen, Deutschland zum Einsatz. Der API-Test ist ein Schnellbestimmungssystem zur Identifizierung von Bakterienspezies basierend auf dem Nachweis biochemischer Reaktionen des Mikroorganismus. Die Auswahl des Teststreifens erfolgte anhand der Ergebnisse der mikroskopischen Differenzierung.

Aus einer frischen Bakterienkolonie wurde eine Bakterien-Suspension hergestellt, die der geforderten Keimdichte (nach Mc Farland) des API-Tests entsprach und anschließend in die Reaktionsgefäße des Teststreifens pipettiert wurde. Gemäß den Herstellerangaben erfolgte ggf. eine Überschichtung mit Paraffinöl sowie die Inkubation und Auswertung. Die genaue Identifizierung der untersuchten Spezies wurde online (apiweb.BioMérieux.com) mit einer Auswertungs-Software durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden das Testsystem API 20E verwendet. Es dient zur Identifizierung von Spezies und Subspezies der *Enterobacteriaceae* und von nicht-fermentierenden gramnegativen Bakterien.

2.6.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Die Identifizierung auf molekularbiologischer Ebene der eingesetzten Stämme von *Yersinia enterocolitica* wurde von Accugenix, Newark, USA durchgeführt.

2.7 MOLEKULARGENETISCHER NACHWEIS DES VIRULENZPLASMIDS VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Das Plasmid von *Yersinia enterocolitica* kodiert für die Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums. Zum Nachweis des Virulenzplasmids in den Bakterienzellen wurde eine PCR mit spezifischen Primern für DNA und Plasmid (s. **Tabelle 2-3**) etabliert.

Dieser Nachweis umfasste die Schritte der DNA Extraktion, der PCR und abschließend der Auftrennung und Detektion der Amplifikationsprodukte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.7.1 DNA-EXTRAKTION

Zum Plasmdnachweis im Standard wurde der DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dazu wurde die Bakteriensuspension (1 ml) bei 11357 x g (13000 rpm) mit der Zentrifuge (Minispin von Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, um die Bakterienzellen zu pelletieren. Danach erfolgten der Aufschluss der Zellen und die Extraktion nach Protokoll.

Für den Nachweis des Plasmids zur Differenzierung durch die Koloniegroße wurde die DNA wie folgt extrahiert: Die Kolonien wurden in 50µl PCR-Wasser resuspendiert und bei 94°C für 10 min aufgeköcht. Das Zelldebris wurde bei 11357 x g (13.000 rpm) mit der Minispin-Zentrifuge für 5 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10µl als PCR Template verwendet.

2.7.2 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Zur Etablierung einer klassischen PCR wurde nach Bhaduri and Pickard (1995), WREN und Tabaqchali (1990) und Feng et al (1992) gearbeitet [31, 32, 74]. Hierbei erfolgte ein direkter Nachweis der *virF*-Region auf dem Plasmid pYV. Zur Kontrolle wurde in jedem PCR-Ansatz auch die *ail*-Region nachgewiesen, die auf dem Bakterienchromosom liegt.

Die Plasmid-Stabilität musste auch während des Einfrierens bzw. Auftauens gewährleistet sein. Dazu wurden verschiedene Ansätze untersucht. Getestet wurde

- Bakteriensuspension im reinen Kulturmedium,
- Bakteriensuspension pelletiert,
- Bakteriensuspension mit Humanalbumin (20%) 1:2 verdünnt,
- Bakteriensuspension pelletiert und in Albumin resuspendiert.

Die PCR wurde eingesetzt, um das Virulenzplasmids von *Yersinia enterocolitica* nachzuweisen. Hierbei wurden durch die verwendeten Primer genau definierte Teile der genomischen (*ail*) und der Plasmid-DNA (*virF*) vervielfältigt. Das Primerpaar *ail1* amplifiziert einen Teil des *ail*-Gens auf dem Chromosom, während das *virF* Primerpaar das Virulenzgen *virF* auf dem Plasmid nachweist. Die unterschiedlich großen DNA-Fragmente konnten auf dem Elektrophorese-Gel durch Ethidiumbromid bzw. Midori Green Direct sichtbar gemacht werden.

TABELLE 2-3: VERWENDETE PRIMER ZUR DURCHFÜHRUNG DER PCR FÜR *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Bezeichnung	Lokus	Sequenz (5'→ 3')	Länge [bp]	Quelle
<i>ail1</i> -FOR ¹⁾	DNA	ACTCGATGATAACTGGGGAG	(20mer)	
<i>ail1</i> -REW ¹⁾	DNA	CCCCCAGTAATCCATAAAGG	(20mer)	Bhaduri S,
<i>virF</i> -FOR ¹⁾	Plasmid	TCATGGCAGAACAGCAGTCAG	(21mer)	Pickard AR,
<i>virF</i> -REW ¹⁾	Plasmid	ACTCATCTTACCATTAAGAAG	(21mer)	1995 [74]

Die Primer wurden von eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland (ehemals MWG) bezogen.

Die Reaktionszyklen wurden in folgendem Thermocycler Touchgene Gradient Thermocycler (Touchgene Gradient, Techne Incorporated, Burlington, USA) durchgeführt.

Für die Vorbereitung der Proben wurde der Taq PCR Core Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland eingesetzt. Um Kreuz- und Fremdkontaminationen zu vermeiden, wurden ausschließlich RNAse/DNAse- und DNA-freie Pipettenspitzen mit integriertem Filter und Reaktionsgefäße mit 1,5 ml und 0,5 ml Volumen verwendet.

In der **Tabelle 2-4** und **Tabelle 2-5** sind die Zusammensetzungen der PCR- Proben zum Nachweis des Virulenzplasmids und des Bakterienchromosoms aufgeführt.

TABELLE 2-4: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE SPEZIFISCHE PCR ZUM NACHWEIS DES PLASMIDS VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Reagenzien PCR	Volumen	Konzentration
dNTPs	insgesamt 1 µL	je 10 mM gelöst in H ₂ O; pH 7,5
Primer Plasmid (virF) reverse + forward	Je 1 µL	10 pmol/µL
10x PCR-Puffer	5 µL	1x (15 mM MgCl ₂)
Taq-Polymerase	0,3 µL	1,5 U/Reaktion
Volumen MasterMix	8,3 µL/Ansatz	
Probe	50 ng DNA	
+ H ₂ O (DEPC)	variabel	
Gesamtvolumen:	50 µL	

TABELLE 2-5: PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE SPEZIFISCHE PCR ZUM NACHWEIS DES CHROMOSOMALEN GENS *ail* VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Reagenzien PCR	Volumen	Konzentration
dNTPs	insgesamt 1 µL	je 10 mM gelöst in H ₂ O; pH 7,5
Primer Genom (ail1) reverse + forward	je 1 µL	10 pmol/µL
10x PCR-Puffer	5 µL	1x (15 mM MgCl ₂)
Taq-Polymerase	0,3 µL	1,5 U/Reaktion
Volumen MasterMix	8,3 µL/Ansatz	
+ Probe	50 ng DNA	
+ H ₂ O (DEPC)	variabel	
Gesamtvolumen:	50 µL	

In der folgenden Tabelle 2-6 ist das Programm des Thermocyclers zusammengestellt. Die PCR wurde direkt im Anschluss an die Herstellung der PCR-Probe gestartet.

TABELLE 2-6: TEMPERATURZYKLEN DER PLASMID SPEZIFISCHEN PCR

Deckel beheizt	1 Zyklus	35 Zyklen			1 Zyklus	Kühlen
	Initiale Denaturierung	Elongation			Finale Extension	
100°C	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4 °C
	300s	30s	30s	60s	60 s	∞

2.7.3 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Um die negativ geladenen DNA-Fragmente im Anschluss an die PCR nach ihrer Größe zu trennen und ihre Größe bestimmen zu können, wurden die PCR-Produkte im elektrischen Feld durch das Agarosegel gezogen. Die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Gelmatrix hängt von der Größe der Moleküle ab (kleine Fragmente wandern schneller als große Moleküle) und durch mitgeführte Marker bekannter Molekülgrößen kann deshalb auf die Anzahl der Basenpaare bzw. auf die Größe geschlossen werden.

Die Aufkonzentrierung der Reaktionsansätze aus der Extraktion auf 10µl erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in der Zentrifuge Speed Vac®Plus, SC 110A von Savant, Ramsey, Minnesota, USA.

Das 1,4%ige Agarosegel wurde folgendermaßen hergestellt: 1,4g Agarose (ROTH, Karlsruhe, Deutschland) wird durch Kochen in 100 ml 1x TAE-Puffer (0,04 M TRIS; 89 mM Acetat; 0,001 M EDTA-Na₂ ad 1000 ml; pH 8,0; hausintern hergestellt) gelöst. Zur Detektion der Banden erfolgt die Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland), das mit der DNA interkaliert und dadurch auf einem UV-Transilluminator eine sichtbare Fluoreszenz erzeugt. Das leicht abgekühlte Gel wurde in die Gelkammer gegossen und der vorher eingesteckte Kamm wurde nach dem Polymerisieren entfernt. Nach Zugabe des Laufpuffer (TAE-Puffer) wurden die mit je 5 µL Auftragspuffer gemischten Proben in die Geltaschen pipettiert und mit einem Amperemeter (BioRad Power-Supply) bei 95 V (\cong 0,04/0,05 A) ca. 2,5 h aufgetrennt. Das Ergebnis wurde anschließend unter UV-Licht betrachtet (Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen Deutschland) und zur weiteren Auswertung fotografisch dokumentiert (Alphamager™2200 & 1220 Documentation & Analysis Systems, Alpha Innotech Corporation, Alphaease™StandAloneSoftware).

Die Proben für die Koloniedifferenzierung wurden in einer kleineren Agarose-Gel-Kammer aufgetrennt. Dazu wurde ein 1,4%iges Gel hergestellt, die Proben aufgetragen, mit TAE-Puffer abgefüllt und mit einer

MUPID ONE Elektrophorese Einheit (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Deutschland) aufgetrennt. Die Proben (7 µl des PCR-Produkts) wurde vor dem Auftragen mit 1 µl Midori Green direct (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Deutschland) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 100 mA für 30min. Die Banden wurden im dazugehörenden Illuminator kontrolliert. Das Gel wurde mit der FastGene GelPic LED Box (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Deutschland) fotografiert und digitalisiert.

Als Größenstandards wurden folgende Marker zur Einordnung der Molekülgröße verwendet:

- Ready-Load™ 100 bp DNA Ladder von Invitrogen, Carlsbad, California, USA
- Ready-Load™ 1 Kb DNA Ladder von Invitrogen, Carlsbad, California, USA
- GelPilot® DNA Molecular Weight Marker Mid-Range Ladder (100), Hilden, Germany

2.8 WACHSTUM VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA* IN BLUT

Die Mehrzahl der Versuche fand in den Lagerbeuteln der Blutkomponenten statt. Es wurde ein verschließbarer Zugang eines leeren sterilen Blutbeutels (GURX0061) von Baxter, Unterschleißheim, Deutschland mit einem Sterile-Connecting-Device (TSCD Terumo® Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland) an den mit Blut gefüllten Beutel steril angeschweißt, um den Zugang während der Probenahme zu erleichtern.

2.8.1 KONTAMINATION VON BLUTBEUTELN

Um eine definierte Keimzahl für die Kontamination der jeweiligen Blutkomponente zu erhalten, musste für jeden Bakterienstamm aus einem gefrorenen Standard eine Verdünnungsreihe angesetzt werden (s. 2.3). Es wurde 1 ml eines aufgetauten definierten Bakterienstandards in einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 9 ml kalter NaCl (0,85%) verdünnt, bis die gewünschte Inokulationskeimzahl pro Milliliter erreicht war. Zwischen jedem Verdünnungsschritt wurde 15 s mit dem Vortexer homogenisiert. Von der erwünschten Verdünnungsstufe wurde 1 ml Suspension folgendermaßen unter sterilen Bedingungen in den Beutel injiziert:

Nach Öffnen des Luer-Lock Zugangs und Entnahme von 5 ml Blut (5 ml Spritze zur Spülung des Zugangs) aus dem Blutbeutel wurde die Bakteriensuspension injiziert. Direkt im Anschluss wurde das vorher zum Spülen des Zugangs entnommene Blut zurück in den Beutel gespritzt. Um unkontrollierten Austritt und

eventuelle unerwünschte Kontamination aus dem Beutel zu verhindern, wurde bei Entnahme aus oder Injektion in den Beutel eine Klemme am Schlauch befestigt. Nach jeder Entnahme wurden die Blutkonserven wieder unter den jeweiligen Bedingungen gelagert.

2.8.2 ENTNAHME VON PROBEN AUS KONTAMINIERTEN BEUTELSYSTEMEN

Die Entnahme von Blut zur Testung auf bakterielles Wachstum wurde folgendermaßen durchgeführt: Zur Spülung wurden mit einer Einmalspritze 5 ml aufgezogen, dann die Probenmenge entnommen und direkt im Anschluss wurde die Spülflüssigkeit wieder in den Beutel injiziert. War eine sehr geringe Keimzahl zu erwarten, wurde eine definierte Menge der Blut-Bakteriensuspension entnommen und unverdünnt auf einer Agarplatte ausgestrichen. Nach längerer Inkubationszeit wurde die Probe so verdünnt, dass eine auszählbare Menge an Kolonien zu erwarten war. Je nach Versuch wurde eine aerobe BacT/ALERT-Flasche mit einer Probe beimpft und in den Automaten eingestellt. Abschließend wurden die Detektionskurven kontrolliert und die Flasche auf mögliche Kontaminanten überprüft.

Vor jedem Experiment wurde eine mikrobiologische Kontrolle mit je 10 ml aerob und anaerob im BacT/ALERT durchgeführt. Die verwendeten Kulturflaschentypen sind bei dem jeweiligen Experiment aufgeführt. Blut für Versuchszwecke im kleineren Maßstab wurde in kleinere Blutbeutel (GURX0061) von Baxter, Unterschleißheim, Deutschland umgefüllt.

Die Schweißverbindungen wurden mit dem Terumo Sterile Connecting Device (TSCD) hergestellt. Zum Abschweißen von Beuteln und Schläuchen wurde eine Schweißzange (Composeal Mobilea, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verwendet.

2.8.3 WACHSTUM IN ERYTHROZYTENKONZENTRATEN

Zur Überprüfung der Wachstumseigenschaften von *Yersinia enterocolitica* wurde mit Erythrozytenkonzentraten (EK) gearbeitet.

Die verwendeten EKs stammten aus Vollblutspenden. Vorversuche fanden mit am Ende der Laufzeit befindlichen oder überlagerten EKs vom DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen gGmbH, Institut Frankfurt/Main statt. Die Blutkonserven wurden gemäß der „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) Novelle 2010“ bei +4°C +/- 2°C aufbewahrt.



Abbildung 2-4: Aufteilung eines außerhalb der Lagerzeit befindlichen EK zur Bestimmung des Wachstums von *Yersinia enterocolitica*.

EK-Versuch Nr.1:

Um das Wachstumsverhalten der beiden *Yersinia enterocolitica*-Stämme im Erythrozytenkonzentrat bei niedrigen Lagertemperaturen zu testen, wurden an zwei Tagen je ein leukozytenabgereichertes, abgelaufenens EK in vier Baxterbeutel (Volumen 40-50 ml) aufgeteilt und mit einer Zielkeimzahl von je ca. 10 und 100 KBE/ml je Stamm (PEI-A-101-01, PEI-A-102) inokuliert (**Abbildung 2-4**). Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden Keimzahlbestimmungen durch das Ausplattierungsverfahren durchgeführt. Die Lagertemperatur der kontaminierten Beutel betrug 4°C.

EK-Versuch Nr. 2:

Zur Kontrolle der Wachstumsfähigkeit bei sehr geringen Keimzahlen wurden drei Standards der 2. Charge (PEI-A-101-02) aufgetaut und gleichermaßen verdünnt. Drei EKs wurden parallel mit je einer hergestellten Verdünnung inokuliert, um Anfangskeimzahlen von ca. 100 KBE/Beutel zu erhalten. Dies entsprach etwa 0,3KBE/ml EK bei einer Komponente mit ca. 300 ml Volumen. Die Beutel wurden bei 4°C inkubiert und innerhalb von 21 Tagen mehrfach beprobt (Keimzahlbestimmungen an den Tagen 0, 2, 4, 7, 14, 21). Die

EKs waren filtriert, hatten das Ende der Haltbarkeit erreicht und stammten aus der Fraktionierung von Vollblutspenden.

2.8.3.1 Wachstum in Additivlösung (PAGGS-M)

PAGGS-M wurde im Filtrationsexperiment und im Vollblutexperiment eingesetzt. Hier sollte der Einfluss auf das bakterielle Wachstum von *Yersinia enterocolitica* untersucht werden.

Um die Entwicklung der Keimzahl über einen Zeitraum von einer Woche zur überprüfen, wurden das Filtrat aus dem PAGGS-M Leukozytendepletionsversuch mit Stamm PEI-A-101-02 bei 4°C inkubiert und nach 48 h und 168 h eine Keimzahlbestimmung durchgeführt.

TABELLE 2-7: ZUSAMMENSETZUNG VON PAGGS-M (MACOPHARMA, LANGEN, DEUTSCHLAND)

Inhaltsstoffe	PAGGS-M
Adenin	0,194 mg
Guanosin	0,408 mg
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	1,255 mg
Mannitol	10,00 mg
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	1,432 mg
Glucose-Monohydrat	9,400 mg
Natriumchlorid	4,210 mg
Aqua ad injec. ad	1,000 ml

2.8.4 WACHSTUM IN THROMBOZYTENKONZENTRATEN

Für Wachstumsuntersuchungen wurden gepoolte Thrombozytenkonzentrate (PTK) verwendet. Sie wurden vom DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen gGmbH zur Verfügung gestellt. Direkt im Anschluss an den Transport wurden die Thrombozytenkonzentrate auf einem Schüttler gemäß der „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) Novelle 2010“ bei +22°C ± 2°C gelagert, um die Sauerstoffversorgung zu gewährleisten und die Agglutination zu verhindern (Schüttler von HELMER PLATELET INCUBATION, Noblesville, USA).

Um das Wachstum in TK festzustellen, wurde in zwei aufeinanderfolgenden Versuchen je ein TK in 50 ml Einheiten aufgeteilt und in Blutbeutel (Baxter) abgefüllt. Daraufhin wurden die Beutel mit *Yersinia enterocolitica* kontaminiert. Es wurde eine Zielkeimzahl von 10 und 100 KBE/ml eingesetzt (s. **Abbildung**

2-5). Ein Beutel wurde mit 65 ml TK (Restvolumen des TKs) gefüllt und mit einem Inokulum von $6,6 \times 10^5$ KBE/ml beimpft. Die theoretische Keimzahl wurde mit $1,02 \times 10^4$ KBE/ml TK bestimmt.



Abbildung 2-5: Schema der Kontamination von TK zur Feststellung des Wachstums von *Yersinia enterocolitica* in TK.

2.8.5 WACHSTUM IN GEFRORENEM FRISCHPLASMA

Zur Wachstumskontrolle von *Yersinia enterocolitica* wurden pro Ansatz 10 ml Plasma in sterile Schraubdeckelröhrchen (15 ml) gefüllt, mit 100 µl Bakteriensuspension (Endkeimzahl im Röhrchen ca. 100 KBE/ml) inokuliert und bei 4°C, Raumtemperatur und 37°C inkubiert. Es wurden vier Plasmen (A bis D) untersucht, die sich aus je zwei Spendern zusammensetzten. Die Wachstumskontrolle fand im Doppelansatz statt. Nach einer Woche erfolgte ein mikrobiologischer Test auf Standard-I-Agar. Nach zwei Wochen wurde eine abschließende Wachstumskontrolle ausplattiert. Zur Überprüfung wurde bei jeder Temperatur einer Negativkontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse wurden semiquantitativ ausgewertet.

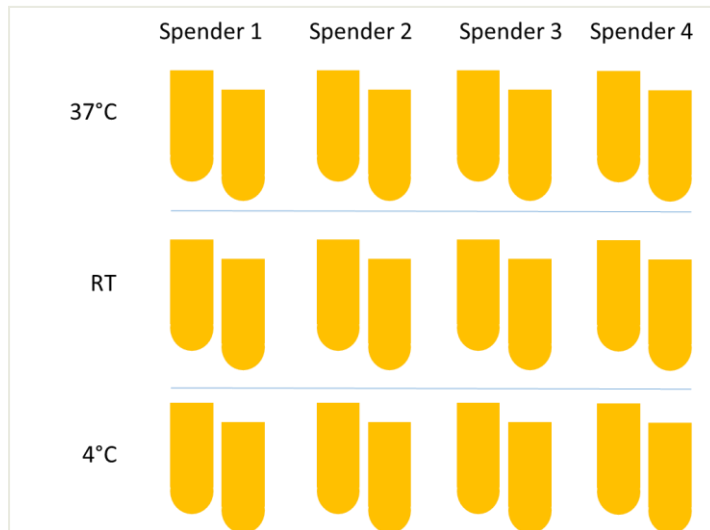


Abbildung 2-6: Schema der Kontamination von Blutplasma. Die Endkeimzahl von PEI-A-101-02 in den Röhren betrug 100KBE/ml.

2.8.6 ARTIFIZIELLE KONTAMINATION VON VOLLBLUT

Die Kontamination und Auftrennung des Vollblutes, zur Verfügung gestellt und ermöglicht vom DRK-Blutspendedienst NSTOB gGmbH (Niedersachsen-Sachsen-Anhalt-Thüringen-Oldenburg-Bremen), wurde mit frisch gespendetem Blut durchgeführt und sowohl in Gera als auch in Springe in den dort ansässigen Instituten realisiert.

VB-Versuch Nr. 1:

In einem ersten orientierenden Versuch wurde frisches Vollblut (500 ml) mit 1 ml eines aufgetauten plasmidhaltigen Bakterienstandards (PEI-A-101-02) inokuliert (Keimzahl des Standards: ca. $2,5 \times 10^7$ KBE/ml). Nach der Kontamination mit *Yersinia enterocolitica* wurde das Vollblut über Nacht (12 h) bei 4°C +/-2°C gelagert. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung in die Komponenten. Die zellulären Bestandteile (EK, TK) wurden möglichst gleichvolumig getrennt und als leukozytendepletierte und unfiltrierte Komponente beprobt.

Wachstum und Verteilung in den Komponenten wurden abhängig von den Lagerbedingungen untersucht und dokumentiert. Die Keimzahlbestimmung (KZB) erfolgte indirekt über Detektion im BacT/ALERT bzw. durch Ausplattieren. Nach Abschluss der Experimente wurden die „sterilen“ Komponenten 14 Tage bei 37°C im Brutschrank gelagert und abschließend im BacT/ALERT (Probenvolumen 10 ml, aerobe Kultivierung) auf Sterilität überprüft. Die Messergebnisse der Kulturflaschen wurden durch Ausstrich auf

Standard-I-Blut-Agar verifiziert. Die **Abbildung 2-7** zeigt das Beprobungsschema von Versuch I. Wachstum wurde je nach Volumen der Blutkomponente und Dauer entweder mit der klassischen Keimzahlbestimmung bestimmt (300 µl Probenvolumen) oder es wurden 10 ml Blut in eine BioMérieux SA-Kulturflasche injiziert und im Bact/ALERT bei 37°C kultiviert. Die abschließende mikrobiologische Kontrolle wurde bei allen Komponenten mit dem Bact/ALERT durchgeführt.

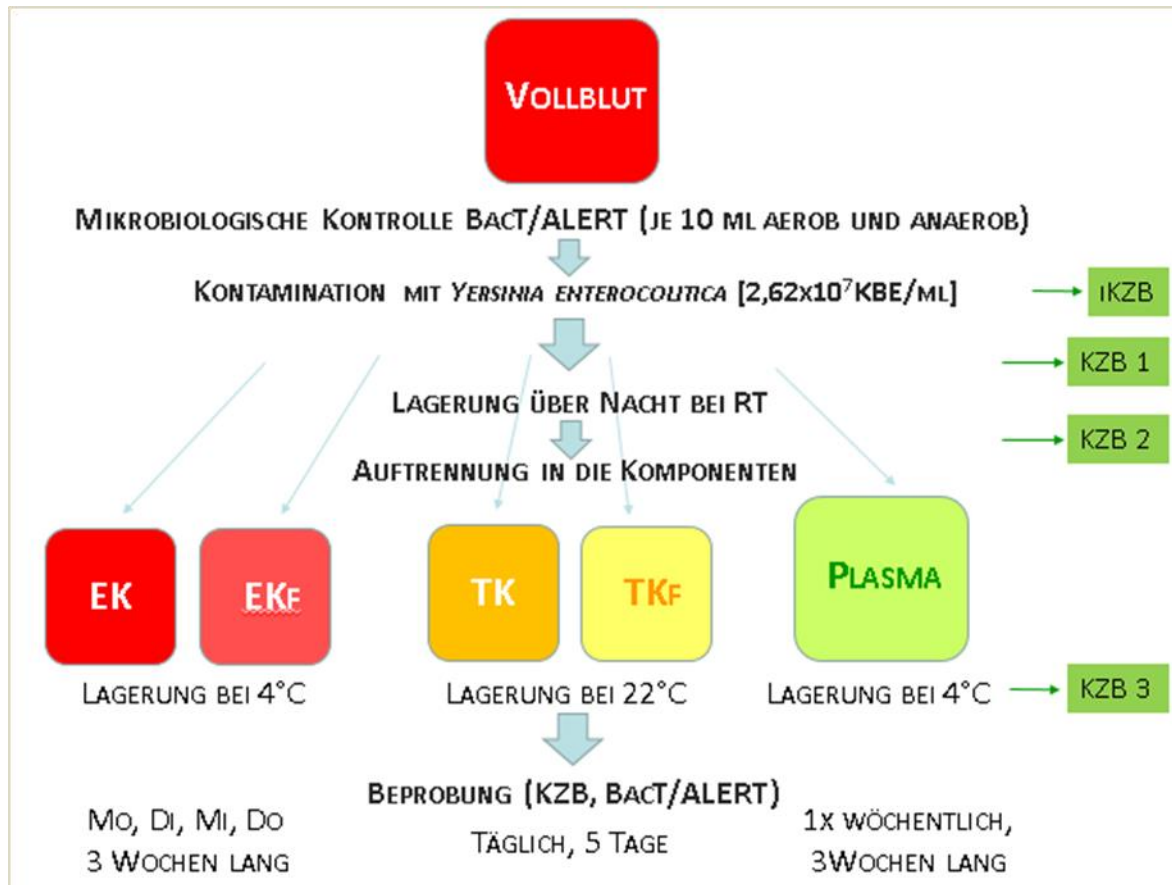


Abbildung 2-7: Schema der Vollblutpräparation.

Vollblut wurde mit 1 ml des plasmidhaltigen *Yersinia enterocolitica* Standards kontaminiert, in die Komponenten aufgetrennt und regelmäßig auf bakterielles Wachstum überprüft. In der Abbildung rechts sind die durchgeführten Keimzahlbestimmungen (KZB) dargestellt (iKZB= Bestimmung der Initialkeimzahl, KZB 1 bis 3 sind chronologisch nummeriert und fanden mit kontaminiertem Blut statt).

Zur Auftrennung wurde das Vollblut zentrifugiert (s. **Tabelle 2-8**). Plasma und EK wurden im Anschluss durch Pressen (BagPress von Bioelettronica, Pall medical, Dreieich, Deutschland) in die am Beutelsystem integrierten Beutel abgetrennt. Zur Herstellung des TKs wurde der Buffy Coat mit Plasma aufgefüllt, bei 22°C und 498 x g (1225 U/min) zur Auftrennung zentrifugiert und mit einem Separator von Biotrans, Dreieich, Deutschland in einen Lagerbeutel abgepresst. Das gewonnene Plasma wurde bis zur

mikrobiologischen Kontrolle (Beprobung) im BacT/ALERT im Kühlschrank bei 4°C gelagert und nicht, wie in der Routine üblich, bei -30°C eingefroren. Die zellulären Komponenten wurden unter Routinebedingungen (TKs bei 22°C unter Agitation, EKs bei 4°C) aufbewahrt.

TABELLE 2-8: HERAEUS CRYOFUGE 6000I, SEPATECH, HANAU, DEUTSCHLAND, VERSUCH I ZUR ZENTRIFUGATION VON VOLLBLUT UND BUFFY COAT IM DRK BSD GERA

Für <u>Vollblut</u> zur Herstellung von GFP, EK und BC	Für <u>Buffy Coat</u> zur Herstellung von TK
Drehzahl: 4000 x g (3530 U/min)	Drehzahl: 498 x g (1225 U/min)
Zeit: 10 min	Zeit: 7,5 min
T: 22°C	T: 22°C

In **Tabelle 2-9** ist der Beprobungszeitraum der Komponenten dargestellt. Da das hergestellte TK-Volumen sehr klein war, wurde 1 ml in die BacT/ALERT Medienflaschen eingespritzt. Das Injektions-Volumen der EK betrug 2 ml. Nachdem sich die Nachweiszeit im BacT/ALERT nicht veränderte, wurde das Probenvolumen auf 1 ml begrenzt um Probenmaterial zu sparen. Das Plasma wurde (hier 10 ml Probevolumen pro Ansatz) im BacT/ALERT untersucht. In den filtrierte Komponenten und im GFP wurde kein Wachstum von *Yersinia enterocolitica* beobachtet.

TABELLE 2-9: PROBENAHMEN DER AUFGETRENNTEN KOMPONENTEN

	0	1	2	3	Sa	So	6	7	8	9	Fr	Sa	So	13	14	15	16	Fr	Sa	So	20	
EK	x	x	x	x			x	x	x	x				x	x	x	x					x
EKf	x	x	x	x			x	x	x													x
TK	x	x	x	x			x	x						x								x
TKf	x	x	x	x			x	x														x
GFP	x	x	x	x			x	x														x

VB-Versuch Nr. 2:

In einem weiteren, größer angelegten Versuch wurde Vollblut von 18 Spendern für die Kontamination verwendet. Die Blutspenden wurde in Beutelsystemen von MacoPharma für EK-In-line Filtration mit PAGGS-M Additivlösung für EK, Referenznummer LQT7247LC gesammelt (**Abbildung 2-8**).

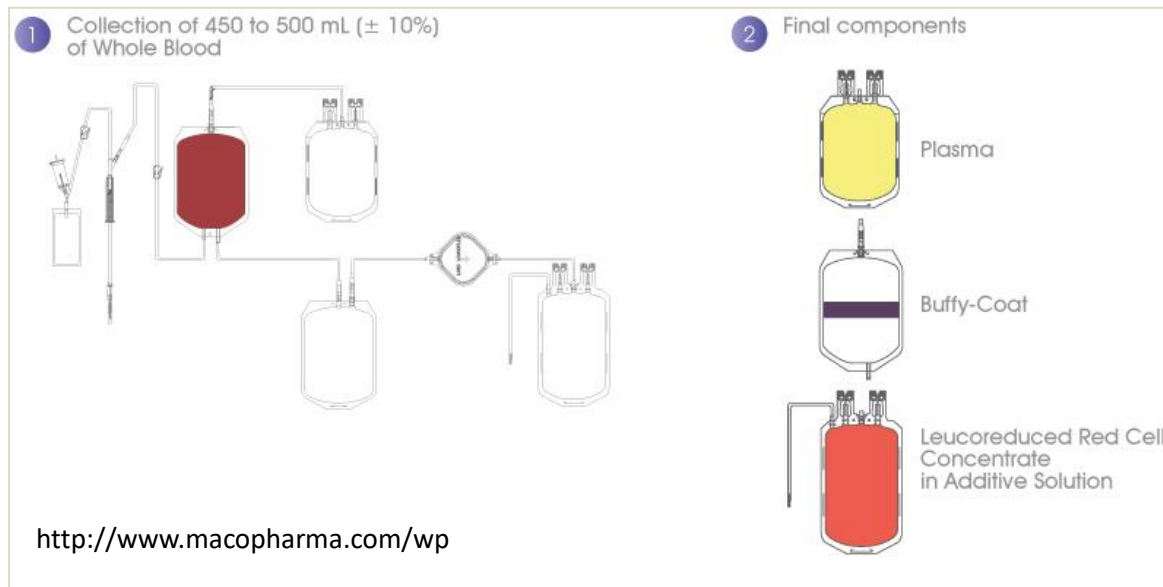


Abbildung 2-8: Schema eines Blutbeutelensystems für die Vollblutspende. Bild 1: Beutel für das Vollblut mit Entnahmesystem und Predonation-Sampling. Nach Zentrifugation fungiert der 2. Beutel oben zur Lagerung des Plasmas. Nach unten wird das EK abgepresst, das dann leukozytendepletiert im Endbeutel verbleibt. Bild 2: Die entstandenen Komponenten. Aus dem Buffy-Coat wird durch Zentrifugation und Abpressen des Überstandes das TK hergestellt.

Es wurden drei Versuchsansätze (A bis C, D bis F und G bis I) nach Schema in **Abbildung 2-9** durchgeführt. Pro Keimzahl und Stamm wurden je drei Parallelläufe durchgeführt, wobei der plasmidlose Stamm nur mit der höheren Keimzahl inokuliert wurde (s.

Tabelle 2-10).

Tabelle 2-10: STÄMME UND INOKULATIONSKEIMZAHLEN ZUR KONTAMINATION DES VOLLBLUTES.

<i>Yersinia enterocolitica</i> Beutel	Bezeichnung	Ausgangskeimzahl [KBE/ml]	SOLL-Keimzahl [KBE/Beutel]
A bis C	PEI-A-102 (pYV-) *	$6,9 \times 10^5$	10^4
D bis F	PEI-A-101 (pYV+)*	2×10^7	10^4
G bis I	PEI-A-101 (pYV+)*	2×10^7	10^1

*Der plasmidlose *Yersinia enterocolitica*-Stamm ist mit pYV-, der plasmidhaltige mit pYV+ markiert.

Jedes Vollblut zur Kontamination bestand aus dem Vollblut von zwei Spendern, um filtrierte und unfiltrierte Proben im Originalvolumen vergleichen zu können. Dazu wurden für jeden Lauf je zwei blutgruppenidentische Vollblute gepoolt (insgesamt 9 Vollblutpools, Anzahl der Vollblute = 18), durchmischt und wieder in die Beutel verteilt. Es wurde darauf geachtet, dass die Blutvolumina in den neu entstandenen Vollbluten möglichst gleich waren, um eine vergleichbare Endkeimzahl in den Beuteln herzustellen. Je 10 ml wurden aus dem Pool für die aerobe und anaerobe mikrobiologische Kontrolle zur Beimpfung von iAST- und iNST-Kulturflaschen entnommen und bei 37°C im Kulturautomaten (Bact/ALERT) inkubiert.

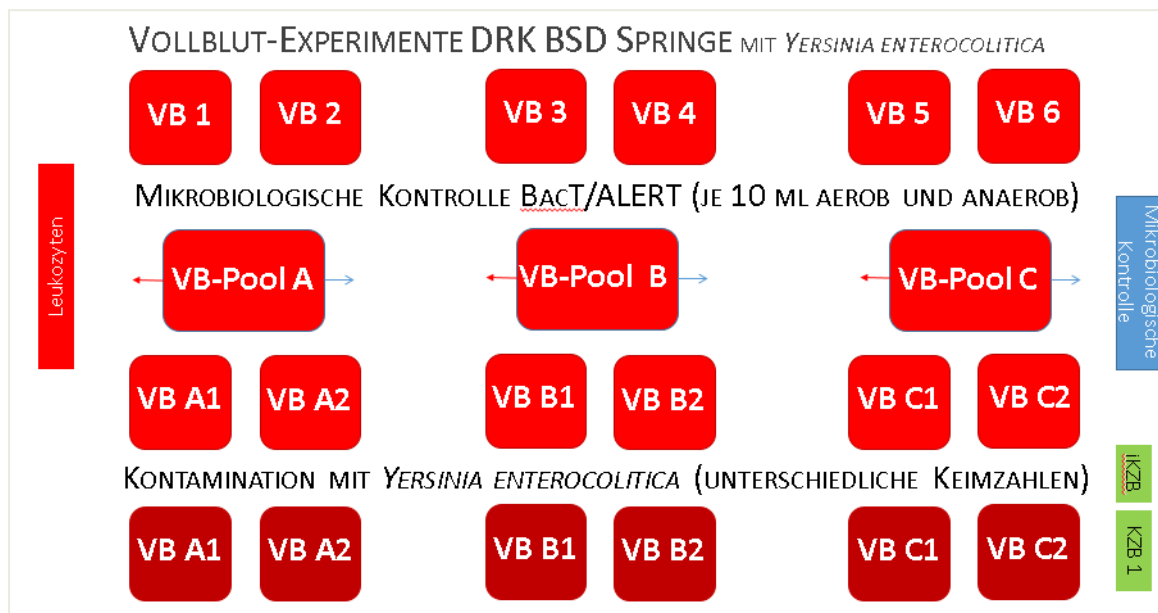


Abbildung 2-9: Schema der Herstellung der VB-Pools, Kontamination mit *Yersinia enterocolitica* und Probenahme. Alle Versuchsansätze A bis I wurden gleich behandelt.

Nach der Beimpfung der Vollblute und anschließender Keimzahlbestimmung wurden die Beutel über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Am nächsten Tag (Tag 1) erfolgte erneut eine Bestimmung der Keimzahl und die Weiterverarbeitung in die Komponenten (s. **Abbildung 2-10**).

Die EK- und TK-Komponenten mit der Ziffer 1 wurden nicht filtrierte, die Komponenten mit der Ziffer 2 wurden filtrierte gelagert.

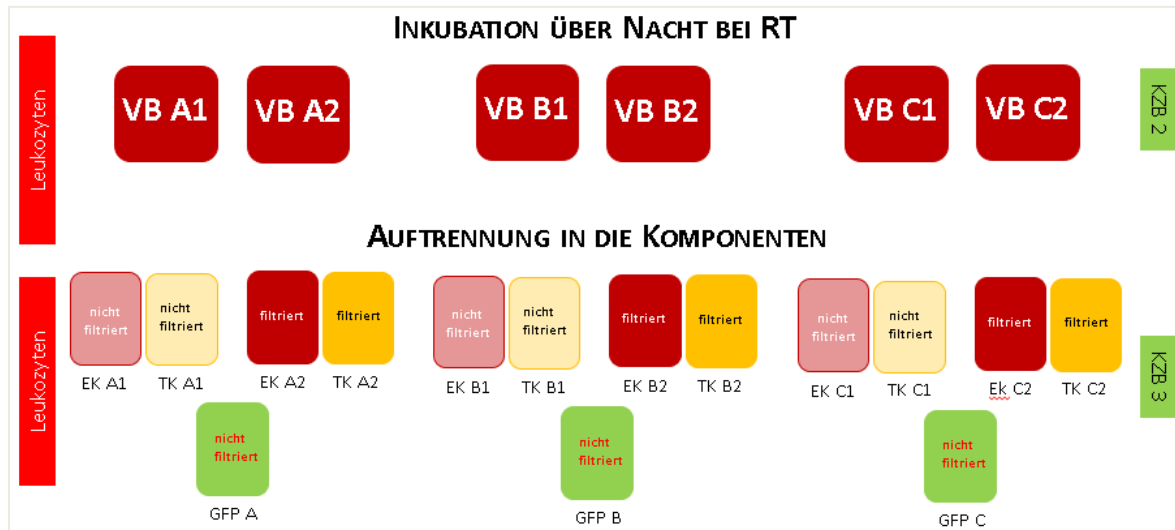


Abbildung 2-10: Schema der Weiterverarbeitung des über Nacht inkubierten Vollblutes. Vor der Auftrennung wurde eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Die Anzahl der Leukozyten wurde aus dem VB-Pool, nach der Inkubation über Nacht und nach der Herstellung der EKs bestimmt.

Die automatische Separation des Vollblutes in Plasma, Buffy Coat und Erythrozytenkonzentrat erfolgte mit der MACOPRESS® SMART, MacoPharma, Langen, Deutschland. Zur Herstellung der TK-Komponenten wurden die Buffy-Coats mit drei weiteren blutgruppenidentischen Buffy-Coats gepoolt, mit 250 ml SSP+ Additivlösung (MacoPharma, Langen, Deutschland) aufgefüllt und mit dem automatischen Separator MacoPress Smart Evo (MacoPharma, Langen, Deutschland) nach Zentrifugation abgepresst.

Zur Herstellung der unfiltrierten TKs wurden eine Handpresse von Fenwal (Plasma Extractor FDR4414, Fenwal, München, Deutschland) verwendet, um einen Abbruch bei der automatisierten Abtrennung durch den fehlenden Leukozytenfilter zu vermeiden.

Nach der Herstellung der Komponenten fand eine regelmäßige Beprobung bis zum Keimnachweis statt. Die gefundenen Kolonien wurden über Gramfärbung und API-Test identifiziert. Zu Beginn der Versuchsreihen wurden aus Kapazitätsgründen Keimzahlbestimmungen durchgeführt (im DRK BSD Springe). Nach Tag 2 wurden alle TK und EK Proben D bis I im BacT/ALERT getestet. Da die Proben A bis C früher angesetzt wurden, war die Testung im Kulturautomaten erst ab Tag 6 möglich (Paul-Ehrlich-Institut). Das Plasma konnte direkt nach Herstellung aufgrund der niedrigen Flaschenzahl im BacT/ALERT untersucht (10 ml bei 37°C) werden, bei -40°C eingefroren und dann bei -30°C gelagert. Da im Paul-Ehrlich-Institut kein Tiefkühler für -30°C zu Verfügung stand, wurden die Plasmen bei -80°C aufbewahrt und nach ca. 3 Monaten auf mikrobielles Wachstum untersucht.

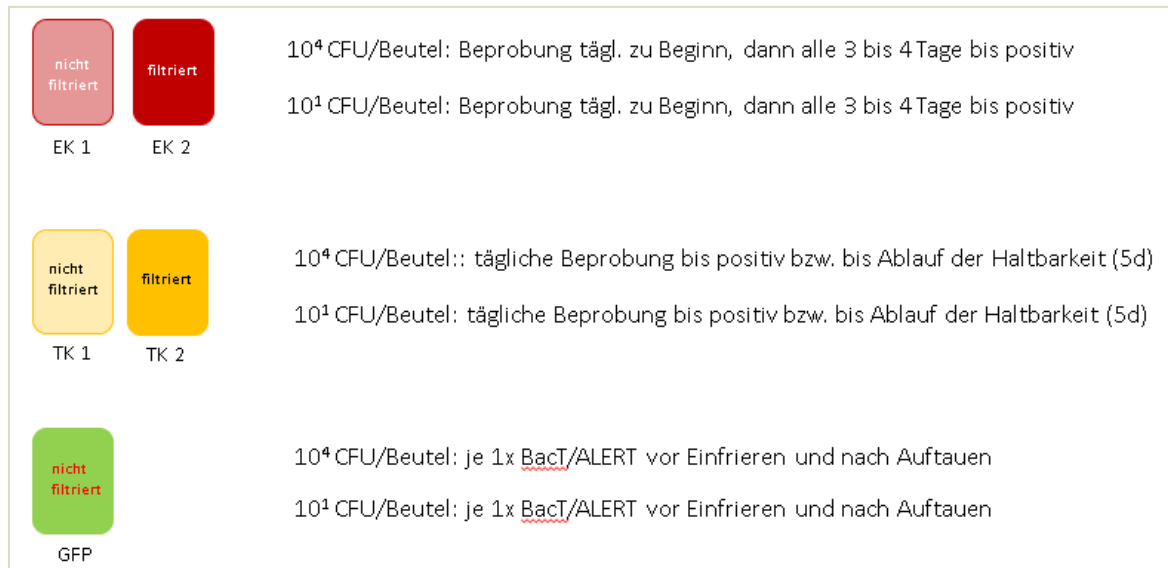


Abbildung 2-11: Beprobungsplan für die mikrobiologische Kontrolle der hergestellten Blutkomponenten.

Die Leukozytenzahlen vor und nach Filtration wurden mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur bestimmt. Zellen bzw. Zellpopulationen können mit dem FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) nach ihrer Größe und Granularität und aufgrund von bestimmten Oberflächenmerkmalen oder intrazellulären Molekülen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht von Laserstrahlen unterschieden und charakterisiert werden.

Zur Zellzahlbestimmung der Leukozyten wurde der BD Leucocount Kit verwendet. Das enthaltende Propidiumiodid färbt die DNA der Leukozyten spezifisch. So können sie von den kernlosen Erythrozyten und Thrombozyten unterschieden werden.

Zur Bestimmung der Anzahl der gezählten Zellen wurden BD Truocount™ Tubes (LOT 15121) mit der Probe gemischt und als Referenz mitgemessen. Bei der Messung wurden die fluoreszenzmarkierten Zellen in einer Trägerflüssigkeit vereinzelt und durch die Emission von optischen Signalen nach Passage eines Lasers detektiert. Das Ergebnis lag nach wenigen Minuten vor.

Die verwendete Software hieß BD CellQuest™ Pro, Version 5.2.1. Das Gerät wurde vor den Messungen mit BD Calibrite™ TM Beads kalibriert (Gerät und alle verwendeten Reagenzien von BectonDickinson, Heidelberg, Deutschland).

Zur Auftrennung der Vollblute in die Komponenten wurden die in **Tabelle 2-11** aufgeführte Zentrifuge mit den dokumentierten Programmeinstellungen verwendet.

TABELLE 2-11: ZENTRIFUGE HETTICH ROTO SILENTA 630 RS, EINSTELLUNGEN ZUR ZENTRIFUGATION VON VOLLBLUT UND BUFFY COAT IM DRK BSD SPRINGE

Für <u>Vollblut</u> zur Herstellung von GFP, EK und BC	Für <u>Buffy Coat</u> zur Herstellung von TK
Anlauf: in ≤ 120 s (ca. 112 s) auf 4068 x g	Anlauf: in ca. 5 min auf 527 x g
Drehzahl: 3530 U/min	Drehzahl: 1300 U/min
Zeit: 10 min	Zeit: 7,5 min
Bremse: 3 (siehe Profil)	Bremse: 2 (siehe Profil)
T: 18 – 23 °C	T: 18 – 23 °C

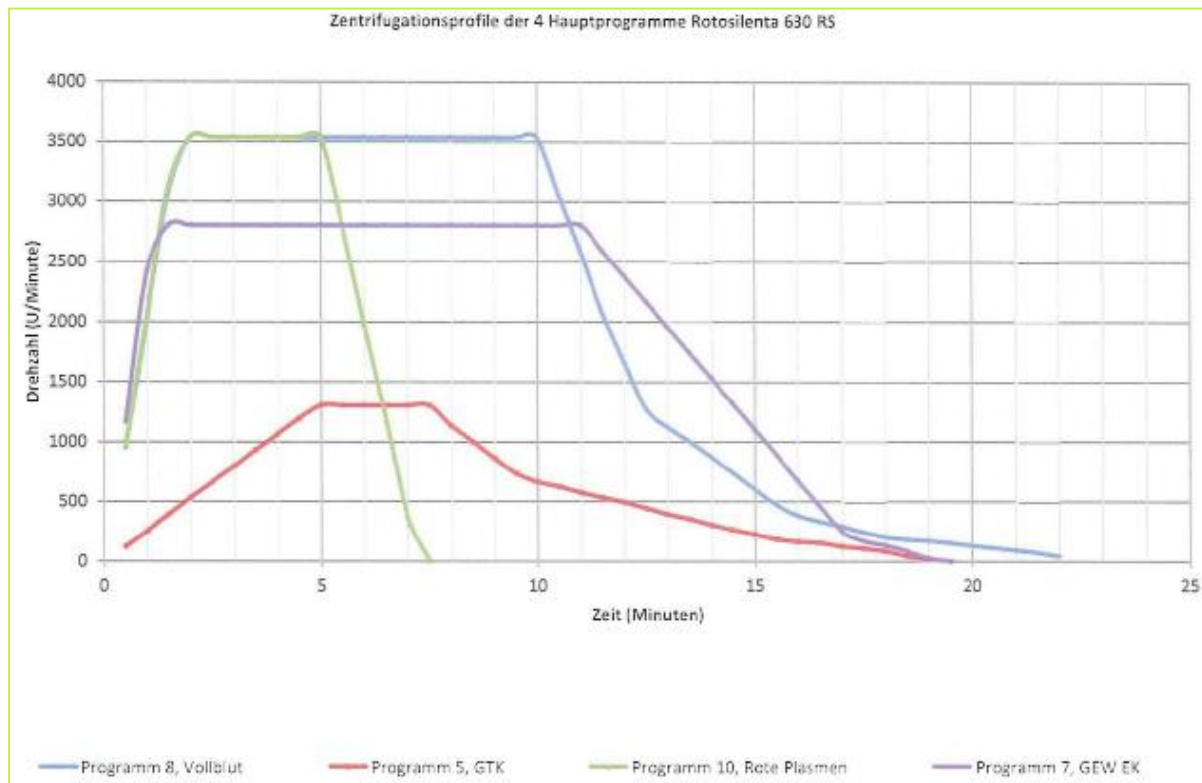


Abbildung 2-12: Zentrifugationsprofile der Zentrifuge Hettich Roto Silenta 630 RS. Es wurden **Programm 8** (blau) und **Programm 5** (rot) zur Zentrifugation von Vollblut und Buffy Coat verwendet.

2.9 LEUKOZYTENFILTRATION VON BLUTKOMPONENTEN

Die Leukozytenfiltration fand mit folgenden Beuteln bzw. Filtern statt:

- Blutbeutel (GURX0061) von Baxter, Unterschleißheim, Deutschland (Einzelbeutel ohne Filter) mit drei verschließbaren Zugängen.
- Filter BIOR 01 PLUS BBS PF mit Lagerbeutel aus PVC (Diethylhexylphthalat DEHP), 40 Einheiten/Karton (9009711), Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland.
- MacoPharma System für EK-In-line Filtration mit Additivlösung PAGGS-M (Referenznummer: LQT7247LC), von Vollblutentnahme-Beutelsystem abgeschweißter Filter mit Lagerbeutel.



Abbildung 2-13: Filter zur Leukozytenfiltration.

A – Trockenfilter mit Beutel von Fresenius Kabi, B - Feuchtfiter von Macopharma

Die Leukozytenfiltrations-Versuche fanden nach dem in **Abbildung 2-14** gezeigten Schema statt:

Im ersten Schritt wurde ein Bakterienstandard 1: 10 verdünnt und in das jeweilige zu filtrierende Produktprobenmaterial inokuliert. Nach Durchmischung fand eine Keimzahlbestimmung (KZB) statt (A-vor Filtration). Es erfolgte das Anschweißen der Beutel A an Leukozytenfilter mit Beutel B. Die Hälfte des Beutelinhalts wurde filtriert und in Beutel B_{0h} aufgefangen. Im Anschluss wurde Beutel B_{0h} abgeschweißt und die Keimzahl daraus bestimmt.

Im zweiten Schritt wurde Beutel A für 4 Stunden bei RT gelagert. Nach 4 h Lagerzeit wurde erneut eine KZB in Beutel A_{4h} durchgeführt, ein weiterer Leukozytenfilter mit Beutel (Beutel B_{4h}) an Beutel A_{4h} angeschweißt und der Rest des Beutels filtriert. Aus Beutel B_{4h} wurde erneut eine KZB durchgeführt.

Aus den beiden Keimzahlbestimmungen, sowohl im ersten als auch im zweiten Schritt, wurden die Retentionsraten des Filters bestimmt, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Die Retention beschreibt die Rückhaltung der Bakterien im Filtermaterial. Dazu wurden die im Beutel B aufgefangenen Bakterien bestimmt und mit der Anfangskeimzahl (vor Filtration) ins Verhältnis gesetzt. Daraus wurde dann der Anteil der Bakterien berechnet, der im Filter zurückgehalten wurde.

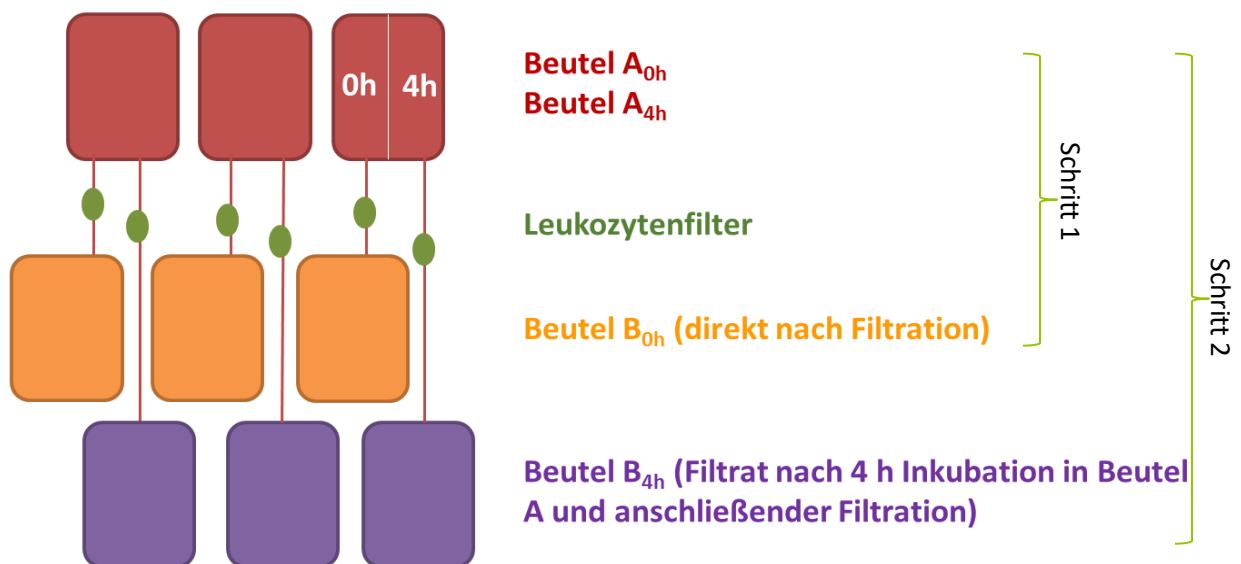


Abbildung 2-14: Schema der Vorgehensweise zur Filtration von Flüssigkeiten kontaminiert mit *Yersinia enterocolitica* durch einen Leukozytenfilter. Schritt 1 beschreibt die Aktion direkt nach Kontamination (0h), Schritt 2 die Vorgehensweise nach 4h.

2.9.1 FILTRATION MIT DER MATRIX NaCl

Es wurden 3 Baxter-Beutel mit 100 ml NaCl (0,85%) gefüllt und je 1 ml der vorverdünnten Bakteriensuspension inokuliert. Zur Filtration wurden Filter und Beutel der Firma Fresenius Kabi verwendet, die zur Herstellung von leukozytendepletierten EKs geeignet waren. In diesen Filtern befand sich keine Additivlösung zur Befeuchtung des Materials.

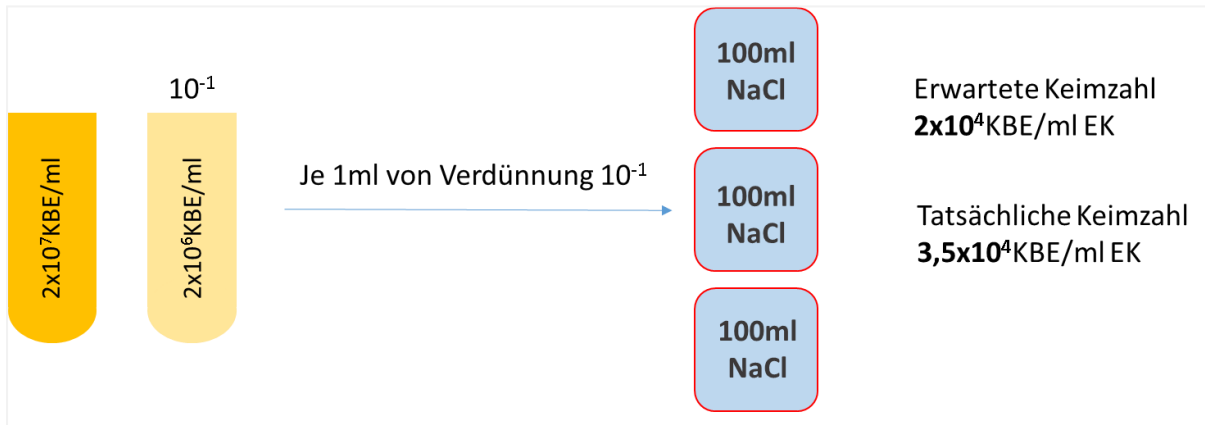


Abbildung 2-15: Inokulationsschema des plasmidhaltigen Stammes von *Yersinia enterocolitica* in NaCl (Mittelwert aus $n=3$).

Die Durchführung erfolgte nach Schritt 1 des Schema (Beprobung Beutel A_{0h} und B_{0h})

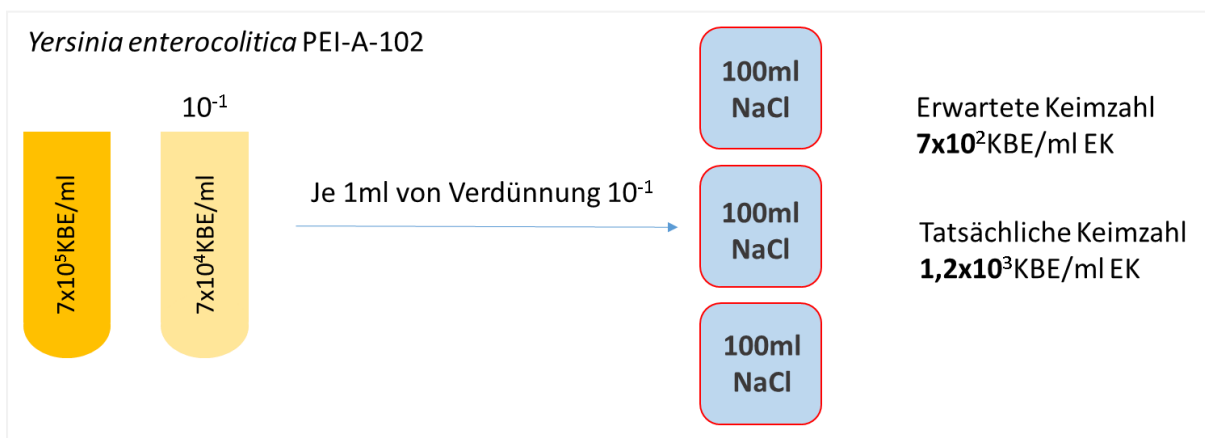


Abbildung 2-16: Inokulationsschema der plasmidlosen Variante von *Yersinia enterocolitica* in NaCl (Mittelwert aus $n=3$).

2.9.2 FILTRATION MIT DER MATRIX ADDITIVLÖSUNG

Das verwendete Filtersystem von Macopharma wird zur Herstellung von filtrierten EK-Komponenten aus Vollblut verwendet und ist Bestandteil des gesamten Beutelsystems. Im EKf-Lagerbeutel befindet sich Additivlösung, die den Filter während der Lagerung feucht hält.

Nicht verwendete Filter mit Lagerbeutel (vom DRK Springe) wurden von VB-Spenden steril abgeschweißt, aus denen keine EKs hergestellt wurden. Vor Beginn des Versuchs wurden die Beutel an ein Stativ gehängt, sodass der Filter mit Additivlösung volllaufen konnte. 5 min vor Kontamination wurde die Lösung wieder in den Beutel laufen lassen und der Filter anschließend ab und andersherum wieder angeschweißt, um die Laufrichtung des Filters zu berücksichtigen. Nach Kontamination wurde nach Schritt 1 gearbeitet, Beutel B war in diesem Fall ein Baxter-Beutel.

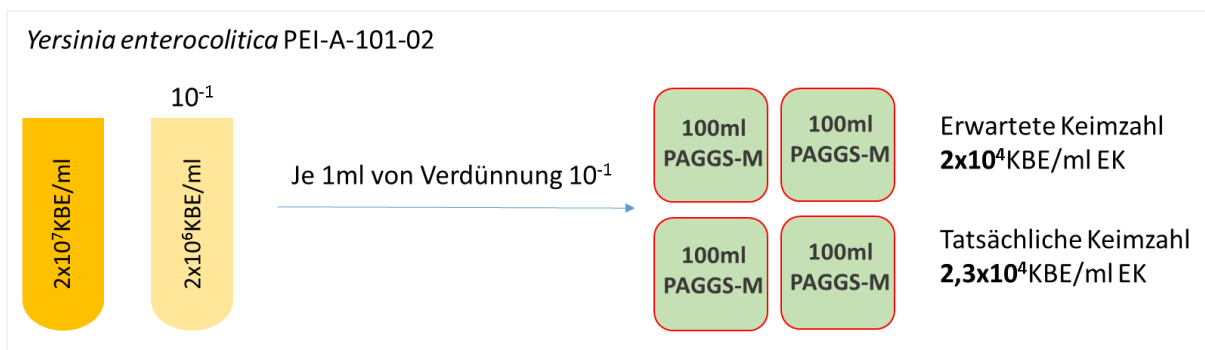


Abbildung 2-17: Inokulationsschema des plasmidhaltigen Stammes von *Yersinia enterocolitica* für Additivlösung PAGGS-M (Mittelwert aus n=4).

2.9.3 FILTRATION MIT LEUKOZYTENDEPLETIERTEM ERYTHROZYTENKONZENTRAT (EKf)

Um den Einfluss von EK auf das Filtrationsverhalten von *Yersinia enterocolitica* zu untersuchen, wurde der Bakterienstandard 1:10 verdünnt. Es wurden 3 Beutel (Baxter) mit je 100 ml EKf gefüllt und mit 1 ml der Bakterienverdünnung versetzt. Die Komponenten befanden sich bereits außerhalb des Lagerzeitraums. Die Durchführung erfolgte nach beiden oben beschriebenen Schritten (s. 2.9.1).

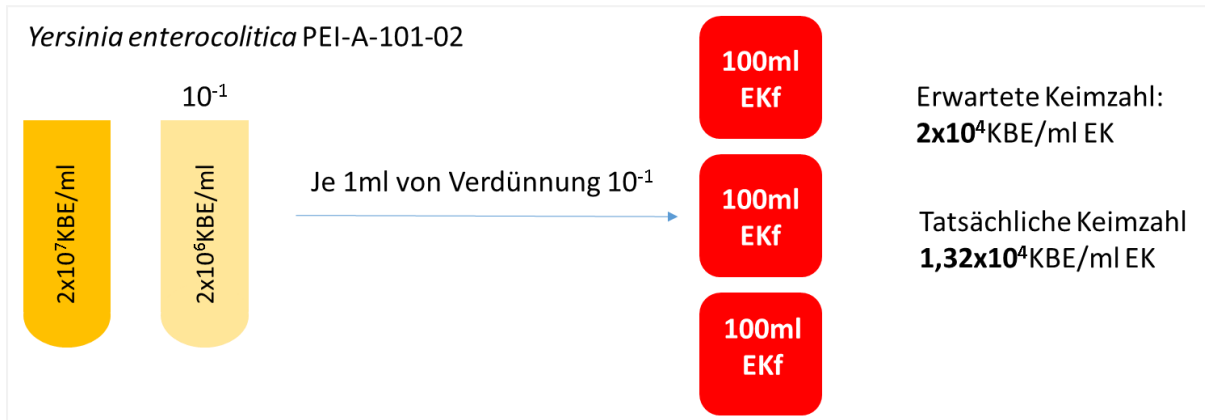


Abbildung 2-18: Inokulationsschema des plasmidhaltigen Stammes von *Yersinia enterocolitica* (Mittelwert von n=3).

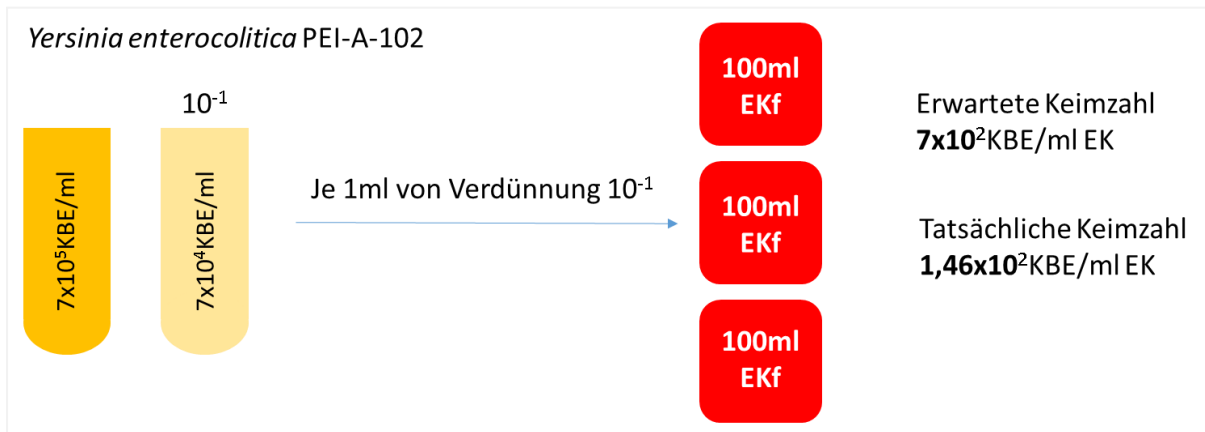


Abbildung 2-19: Inokulationsschema für den plasmidlosen Stamm *Yersinia enterocolitica* (Mittelwert von n=3).

Für die Versuche zum Retentionsverhalten von *Yersinia enterocolitica* in Gegenwart von EKf wurden Trockenfilter mit Lagerbeutel (**Abbildung 2-13**, Bild A) verwendet.

2.9.4 FILTRATION MIT NICHT LEUKOZYTENDEPLETIERTEM ERYTHROZYTENKONZENTRAT (EK)

Der Einfluss von Monozyten auf Bakterienzahl und Retention des virulenten Stammes wurde mit frischen, unfiltrierten EKs untersucht. Dazu wurden von DRK BSD Baden-Württemberg-Hessen die benötigten EKs zur Verfügung gestellt. Die EKs stammten aus Vollblutspenden, die im BSD nicht weiterverarbeitet wurden, da sie die Kriterien zur Herstellung von Blutkomponenten nicht erfüllten. Das EK-Volumen pro Beutel betrug ca. 300 ml. Nach der Separation wurden sie bis zum Versuchsbeginn gekühlt (Versuch 1: bei 4°C max. 48h, Beutel 1 bis 4) oder bei Raumtemperatur (Versuch 2: max. 24h, Beutel 5-8) gelagert. Zur Inokulation wurden 2 Standards aufgetaut, gemischt und verdünnt. Die Kontaminationskeimzahlen der eingesetzten Standards wurden bestimmt. Ein Beutel wurde als Negativ-Kontrolle mitgeführt. Die Versuchsdurchführung ist nach den Schritten 1 und 2 erfolgt.

Zur Bestimmung der Leukozytenzahlen vor (bei allen EKs) und nach der Filtration (nur bei der Negativkontrolle) wurde das Sysmex XS-1000i (Sysmex, Norderstedt, Deutschland) eingesetzt. Die Räumlichkeiten erlaubten die Messung einer kontaminierten Probe nicht. **Abbildung 2-14** zeigt die schematische Darstellung des Versuchsablaufes.

Das Sysmex ist ein Fluoreszenz-Durchfluss-Zytometer, das die Blutzellen während des Durchtritts durch eine Messzelle vermisst. Über das emittierte Streulicht können die Blutzellen differenziert und quantifiziert werden.

Abbildung 2-20 zeigt das Inokulationsschema.



Abbildung 2-20: Inokulationsschema für den plasmidhaltigen Stamm von *Yersinia enterocolitica* (Mittelwert von n=4).

2.10 FRAKTIONIERUNG VON VOLLBLUT

Vollblut von drei Spendern (je 40 ml) wurde gleichmäßig (8 ml) in vier 15 ml Falcon-Röhrchen verteilt und mit einer definierten Keimzahl kontaminiert. Nach Durchmischung wurden die Röhrchen bei 4000 x g (4400 rpm) in einer Heraeus Zentrifuge (Multifuge 3 S-R Rotor Sorvall mit Ausschwenkeinsatz für 12 Falcon-Röhrchen) für 10 min zentrifugiert und ungebremst auslaufen lassen. Die entstandenen Schichten wurden durch Ausplattieren (Standard-I-Agar) auf bakterielles Wachstum untersucht. Die getesteten Volumina lagen bei 300 µl, wobei 3 Platten mit jeweils 100 µl inokuliert wurden

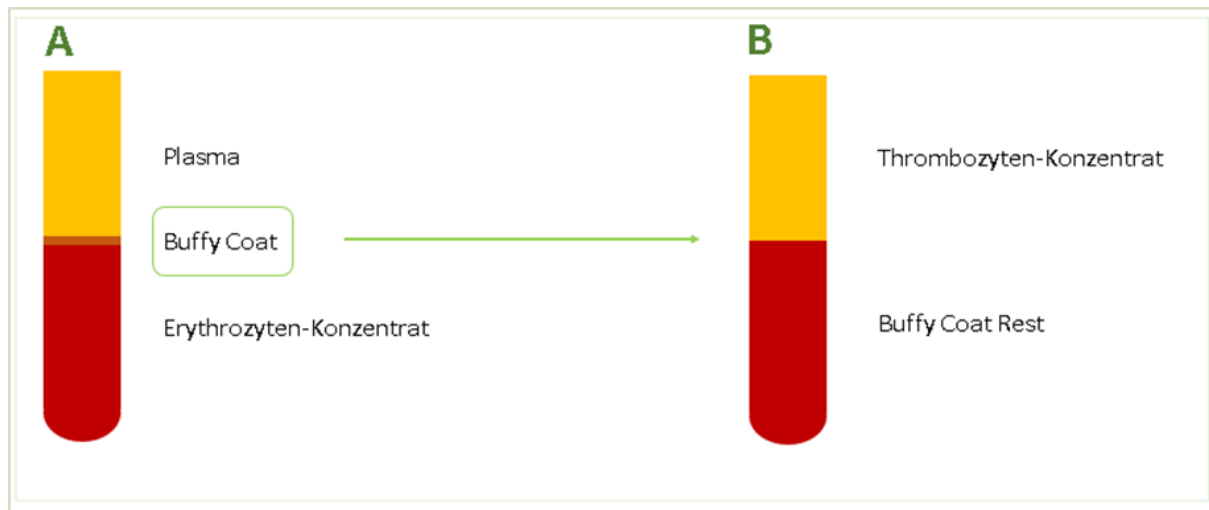


Abbildung 2-21: Fraktionierung des Vollblutes durch Zentrifugation (A) und anschließende Herstellung der Komponente TK (B).

Zur Herstellung der TK Fraktion wurden drei Buffy Coats (bezogen vom DRK BSD Baden-Württemberg-Hessen, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt/Main), jedes gleichmäßig auf 4 Falcon-Röhrchen verteilt und mit $1,75 \times 10^5$ KBE/ml BC kontaminiert. Nach der Keimzahlbestimmung wurde bei 527 x g (1600 rpm) mit obiger Zentrifuge zentrifugiert und die obere thrombozytenreiche Schicht abpipettiert. Aus beiden Fraktionen (TK und BC-Rest) wurden die Keimzahlen bestimmt. Die **Abbildung 2-21** zeigt die Phasen nach der Zentrifugation des Vollblutes (A) bzw. des Buffy-Coats (B).

3 ERGEBNISSE

3.1 HERSTELLUNG EINES PLASMIDHALTIGEN BAKTERIENSTANDARDS VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Aus den vom Leibniz-Institut DSMZ- Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogenen Stämmen wurden Stammkulturen in Cryoröhrchen (s. Kapitel 2.5) und im Anschluss MasterCellBanken hergestellt, die ein plasmidhaltiges und ein plasmidloses Ausgangsprodukt gewährleisteten (Kontrolle durch PCR). Aus den MasterCellBanken wurden die Standards (PEI-A-101, YEP⁺ und PEI-A-102, YEP⁻) hergestellt.

3.1.1 KULTIVIERUNG VON PLASMIDHALTIGER *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Zur Erhaltung des Plasmids *in vitro* und für die Produktion der Proteine mussten die Umgebungsbedingungen für das Bakterium angepasst werden, da auf dem Plasmid keine Antibiotika-Resistenz vorliegt. Dazu waren verschiedene Faktoren zu berücksichtigen:

3.1.2 KALZIUMGEHALT IM KULTURMEDIUM

Um die Wirkung des Kalziumgehalts auf die Stabilität des Plasmids zu untersuchen, wurde eine Kultur des plasmidhaltigen Teststammes ohne Ca²⁺-Zusatz weitergeführt und die ersten vier Passagen auf plasmidhaltige *Yersinia enterocolitica* Zellen untersucht.

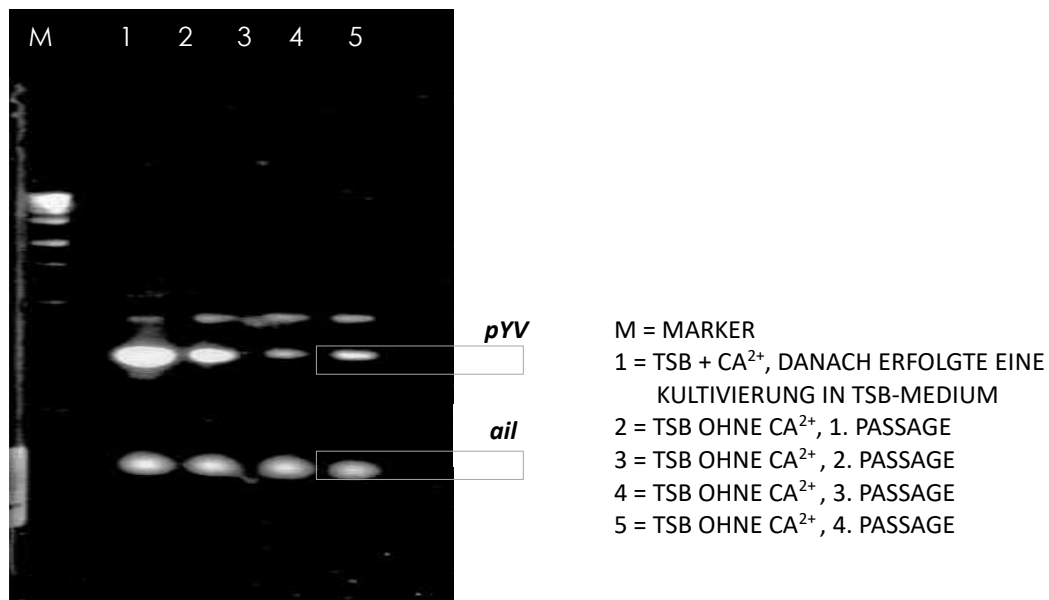


Abbildung 3-1: Einfluss der Passagen (Subkultivierung) ohne Kalzium auf die Plasmidexprimierung (PEI-A-101-01).

Wachstumsexperimente wurden sowohl mit als auch ohne Ca²⁺-Zusatz durchgeführt. Die *virF*-Bande der plasmidhaltigen Stämme in TSB-Medium ohne Ca²⁺ wird mit der Zunahme an Passagen immer schwächer (s. **Abbildung 3-1**).

Dauerhafte Zugabe von Kalzium im Medium dagegen ergibt bei mehreren Passagen nacheinander keine Veränderungen bei der PCR-Amplifikation. Auch nach der 5. Passage mit Ca²⁺ ist die Plasmidbande noch deutlich sichtbar und unterscheidet sich in der Stärke nicht von der Bande des zum Vergleich aufgetauten Inokulums.

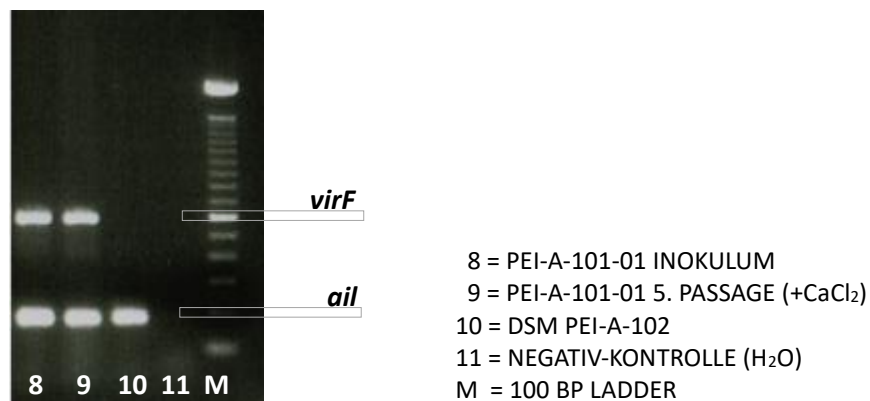


Abbildung 3-2: Agarose-Gel der beiden verwendeten Standards.

Der plasmidhaltige aufgetaute Standard ist in Spur 8, der plasmidhaltige Stamm nach 5 Passagen in Spur 9 und der plasmidlose Stamm in Spur 10 auftragen.

Auf dem Gel in **Abbildung 3-2**, Spur 9 ist das Extrakt von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-01 nach der 5. Passage in kalziumhaltigem Medium aufgetragen. Sowohl die *ail*-Bande bei 170 bp als auch die Plasmidbande bei 591 bp sind sichtbar. Zum Vergleich ist in Spur 8 ein aufgetauter Standard derselben Charge und in Spur 10 der plasmidlose Stamm aufgetragen worden (**Abbildung 3-2**).

3.1.3 INKUBATIONSTEMPERATUR

In der Literatur wird ein optimaler Temperaturbereich zur Konservierung des Plasmids beschrieben, der zwischen 26°C und 37°C liegt [49]. In der vorliegenden Studie wurden Experimente bei 28°C und 37°C durchgeführt, die die Angaben aus der Literaturstelle bestätigten. Um die Effektorproteine nachzuweisen ist laut Li et al 1998 eine Temperatur von mindestens 32°C notwendig. Der Fokus lag in erster Linie auf der Erhaltung des Plasmids. Weiterführende Versuche wurden deshalb bei einer Temperatur von 28°C angesetzt, so dass die Produktion der Effektorproteine nicht in großem Maße stattfand (Stressreduktion) [49].

3.1.4 PH-WERT DES MEDIUMS

Der zur Stabilisierung des Plasmids ausreichende pH-Wert eines mit CaCl₂ versetzten TSB-Mediums betrug 6,7 bis 6,9. Es wurde auf die dauerhafte pH-Wert-Einstellung der neu angesetzten Medien verzichtet, um Fremdkontaminationen der angesetzten Medien durch die nicht sterilisierbare Messelektrode bzw. Probenahmen ausschließen zu können. Die Kulturmedien wurden regelmäßig der Qualitätskontrolle durch den Hersteller unterzogen. Deshalb war eine größere Schwankung im pH-Bereich nicht zu erwarten [205].

3.1.5 ANZUCHT UND STAMMHALTUNG

Die beiden Referenzstämme von *Yersinia enterocolitica* DSM 11502 und DSM 9676 wurden lyophilisiert bezogen, kultiviert und mikroskopisch, biochemisch und molekularbiologisch überprüft, um später ggf. Mutationen oder Adaptionen durch längere Kultivierung und Passagen erkennen zu können.

3.2 STABILITÄT DER HERGESTELLTEN BAKTERIENSTANDARDS VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Zur Überprüfung des Bakterienstandards von *Yersinia enterocolitica* wurde neben der Bakterienzahl auch der Plasmidgehalt bestimmt.

3.2.1 EINFRIERVERSUCHE

Da die Lagerung der Bakterien-Standards bei -80°C stattfand, musste die Stabilität des Plasmids während des Gefrier- bzw. des Auftauvorgangs und auch bei der Rekultivierung gewährleistet sein.

Gemäß Standardprotokoll (s. 2.5) zur Herstellung des plasmidhaltigen PEI-A-101-01 Standards wurden jeweils 1,5 ml der Bakteriensuspension mit und ohne Zusatz von Albumin (im Verhältnis 1:1) eingefroren (Bande 2 und 4). Als Vergleich diente eine 24-h-Kultur, die nicht eingefroren wurde (Bande 1). Außerdem wurden einmal 1,5 ml der Bakteriensuspension durch Zentrifugation pelletiert und mit Überstand eingefroren (Bande 3), einmal mit Albumin resuspendiert und eingefroren (Bande 5).

Anschließend wurde anhand einer PCR überprüft, ob das Plasmid noch in den aufgetauten Bakterienzellen vorlag. Sowohl das *ail*-Gen, als auch die *virF*-Bande konnten bei allen Ansätzen wiedergefunden werden (Abbildung 3.3).

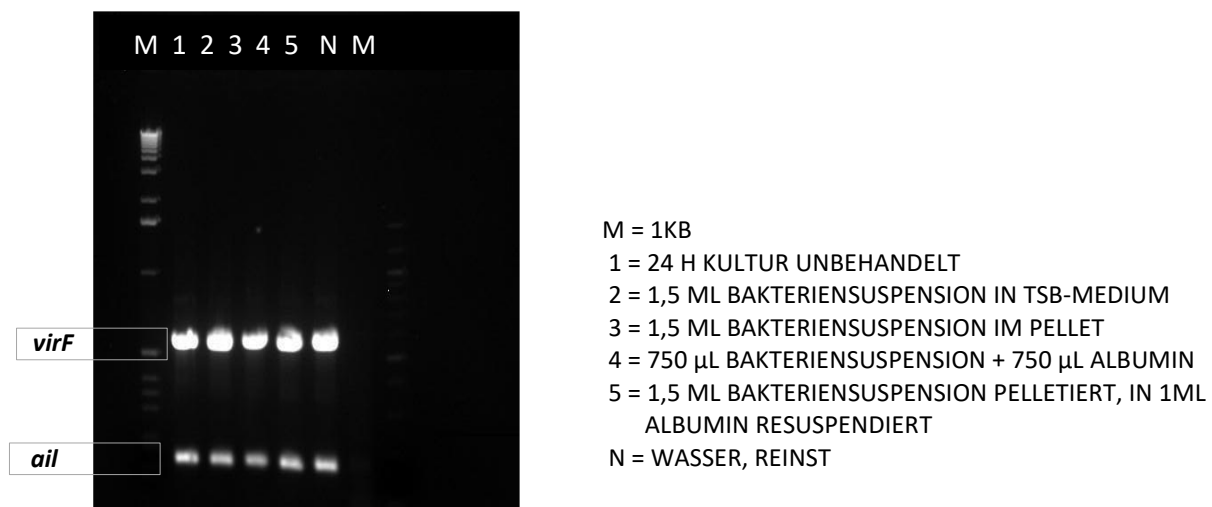


Abbildung 3-3: Einfrierversuch mit und ohne Albumin und mit und ohne Pellet (PEI-101-01).

Zur Überprüfung der Stabilität der Standards und der Reproduzierbarkeit der Bakterienzahlen wurde die Keimzahl der beiden *Yersinia enterocolitica*-Stämme überprüft. In **Abbildung 3-4** und **Abbildung 3-5** sind

die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen der Teststämme PEI-A-101-02 und PEI-A-102 seit Herstellung und Lagerung bei -80°C bis Ende 2015 gezeigt.

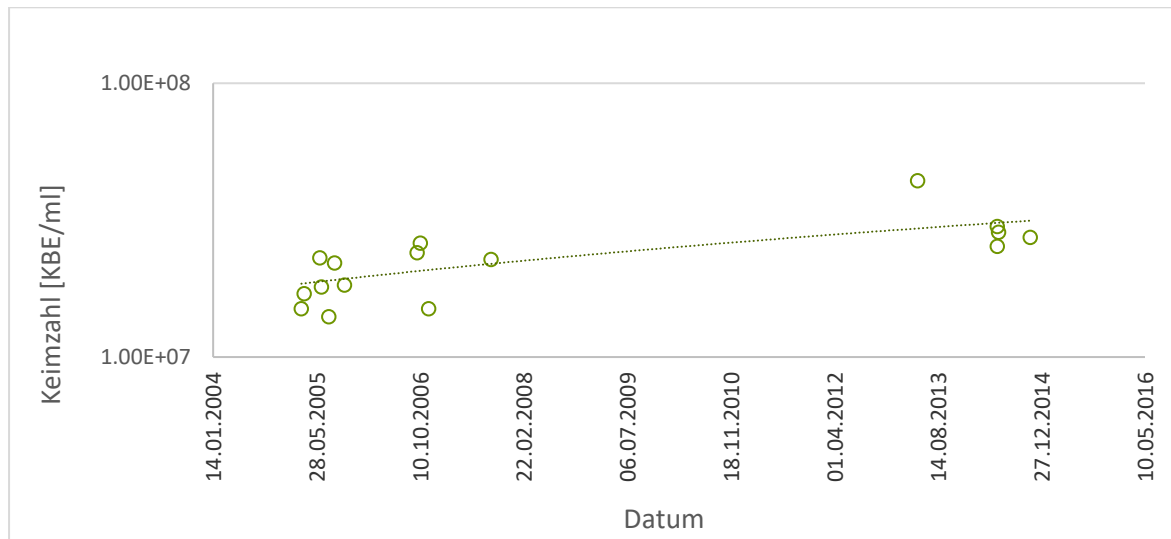


Abbildung 3-4: Stabilitätsdaten von *Yersinia enterocolitica* Standard PEI-A-101-02 (n=17), hergestellt am 15. März 2005

Der Mittelwert der 17 durchgeführten Keimzahlbestimmungen lag bei $2,34 \times 10^7$ KBE/ml im Standard PEI-A-101-02, die Standardabweichung wurde mit $7,37 \times 10^6$ KBE/ml ermittelt.

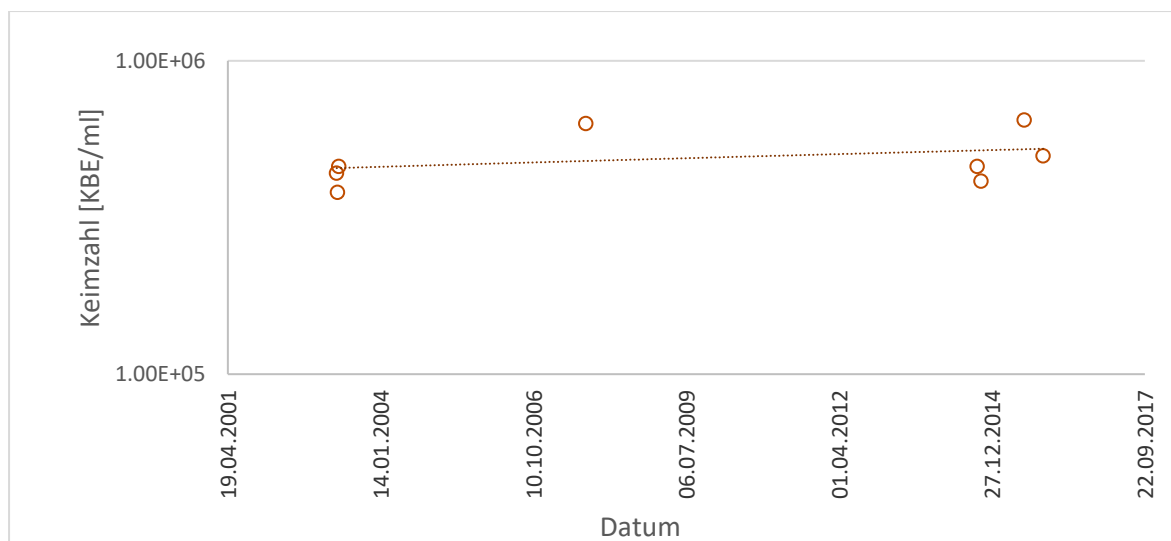


Abbildung 3-5: Stabilitätsdaten des Standards PEI-A-102 (n=8), hergestellt am 20. März.2003

Im Standard PEI-A-102 lagen im Durchschnitt $4,91 \times 10^5$ KBE/ml vor, die Standardabweichung betrug $9,77 \times 10^4$ KBE/ml. Es wurden acht Keimzahlbestimmungen in die Auswertung miteinbezogen.

Die Keimzahl der *Yersinia enterocolitica*-Standards blieb über Jahre weitgehend konstant.

3.3 NACHWEIS DES VIRULENZPLASMIDS PYV WÄHREND DER STANDARDHERSTELLUNG

Um den Einfluss des Einfrier- und Auftauvorgangs auf das Plasmid zu untersuchen, wurden die Gene *virF* und *ail* zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Herstellung des Bakterienstandards anhand von Multiplex-PCR nachgewiesen. Der Nachweis fand vor Herstellung im SyLab, direkt vor dem Einfrieren und nach einer Einfrierzeit von mindestens 24 Stunden bei -80°C statt. Es wurde bei keinem der unterschiedlichen Ansätze ein Verlust der Plasmidbande festgestellt (s. **Abbildung 3-6**). Auch nach Kultivierung im geeigneten Medium war kein Verlust des Plasmids festzustellen. Die Banden 2 bis 4 waren durch die Herstellung der Standardinokula mit Albumin im Verhältnis 1:1 verdünnt.

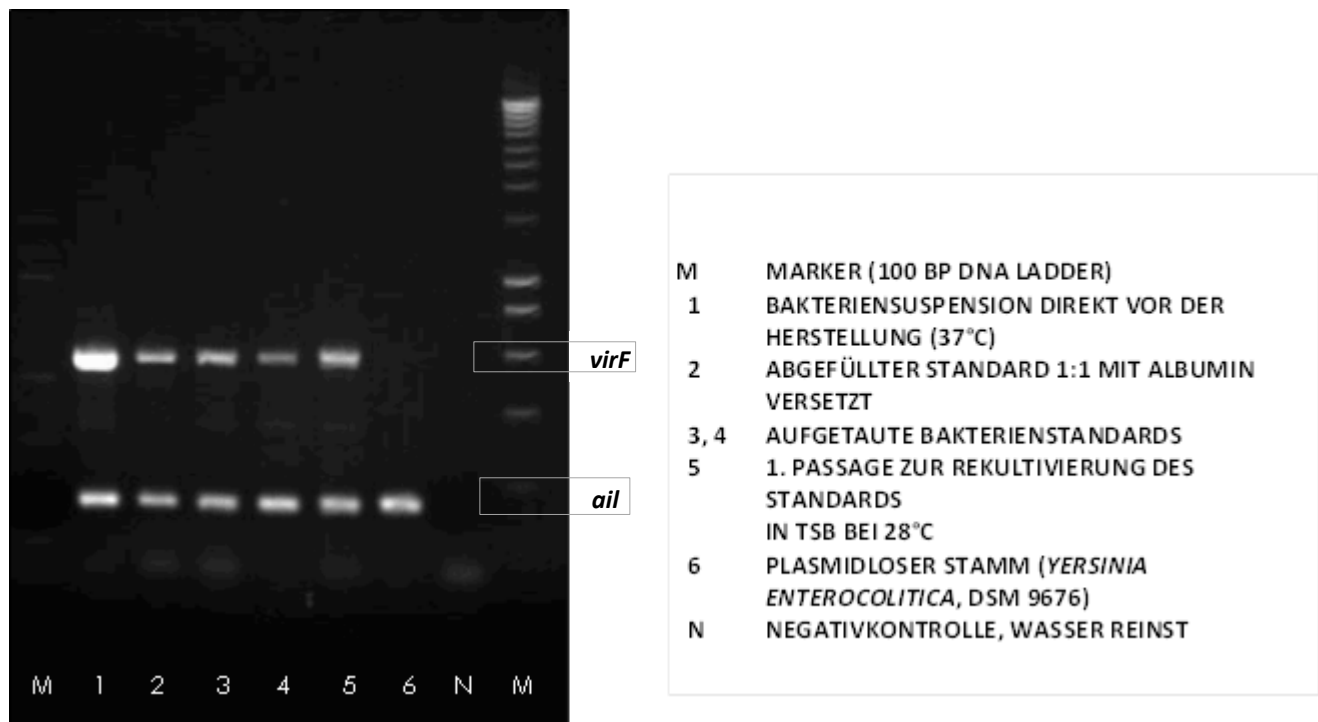


Abbildung 3-6: Plasmid Stabilität während der Herstellung des Standards PEI-101-02

3.4 QUANTIFIZIERUNG DER PLASMIDTRAGENDEN ZELLEN

Um die Anzahl der plasmidpositiven Bakterienzellen im Standard PEI-A-101-02 festzustellen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet.

3.4.1 DIFFERENZIERUNG DER PLASMIDHALTIGEN UND PLASMIDLOSEN ZELLEN ANHAND DER KOLONIEGRÖÖE IM STANDARD PEI-A-101-02

Nach dem Auftauen eines Standards wurde auf Standard-I-Blutagar eine geeignete Verdünnungsstufe ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die gut sichtbaren Kolonien markiert. Nach 48 Stunden konnten auch die kleinen Kolonien mit bloßem Auge gut abgegrenzt und umkreist werden (**Abbildung 3-7**). Die markierten Kolonien wurden mit Einmal-Impfösen abgepickt und auf Plasmidbesitz untersucht.

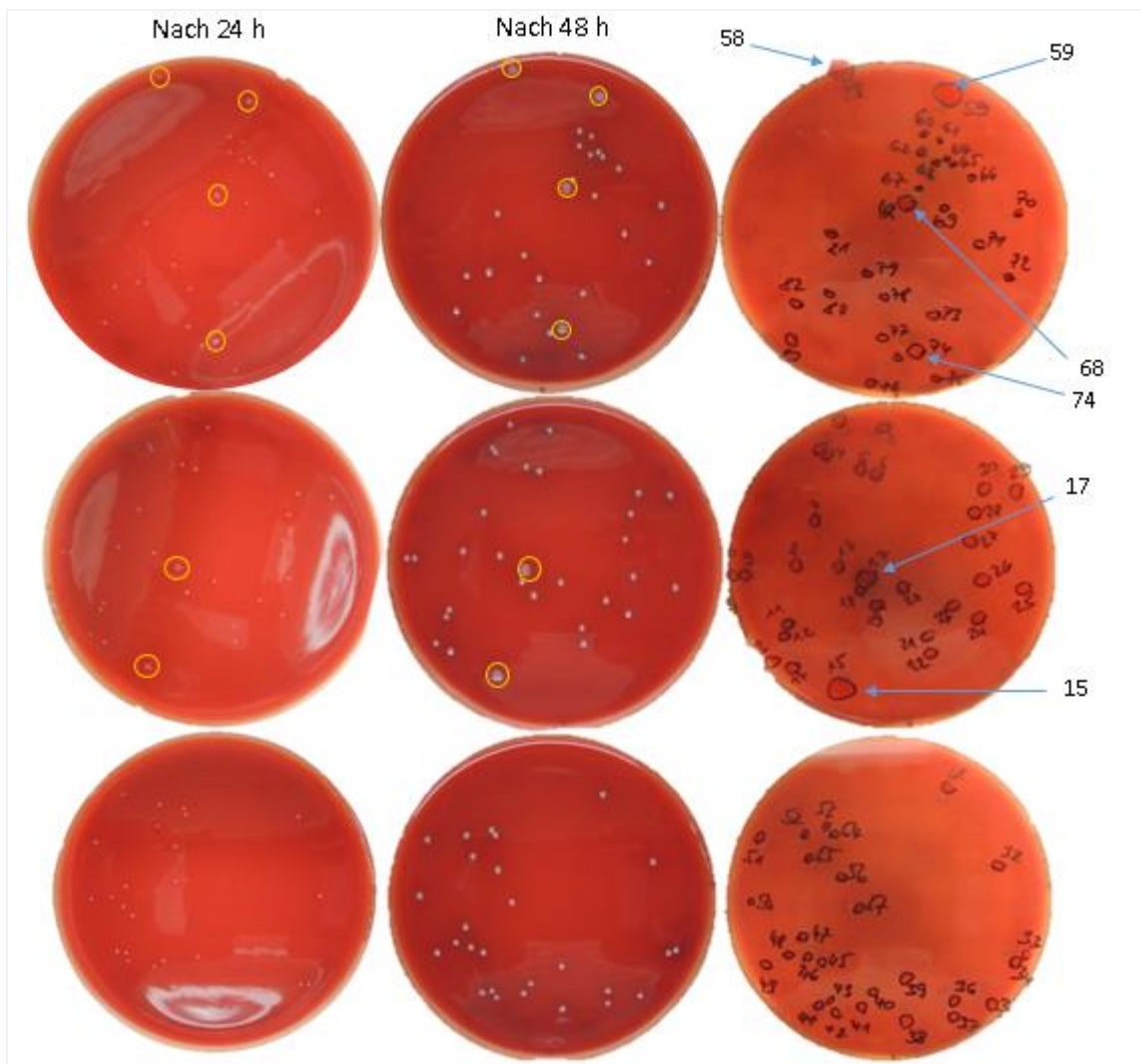


Abbildung 3-7: Größendifferenzierung der Kolonien auf Standard-I-Blutagar

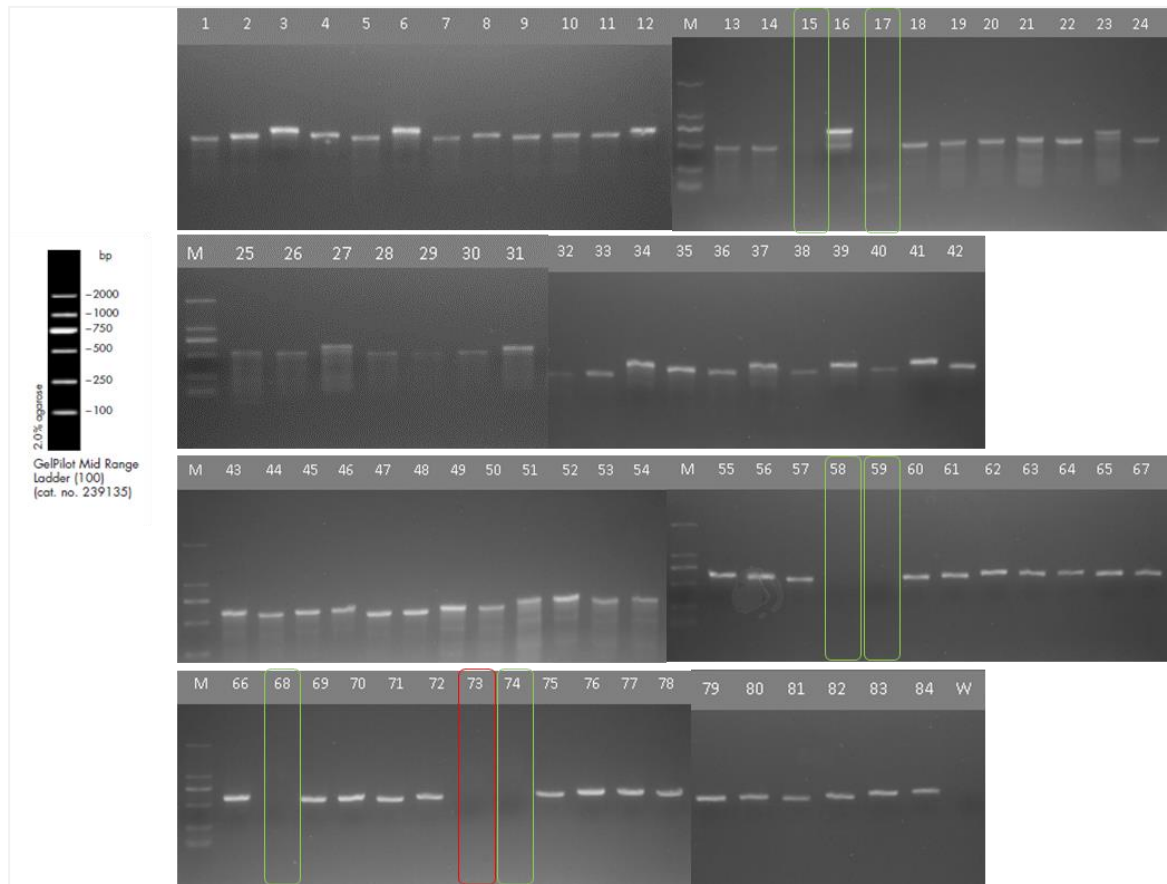


Abbildung 3-8: Nachweis des Virulenzplasmids von *Yersinia enterocolitica*

Die Plasmidbanden wurden in einem Agarosegel sichtbar gemacht. Bei allen großen Kolonien konnte keine Bande bei 571 kb festgestellt werden (grüne Rahmen in **Abbildung 3-8**). Bei 77 kleinen Kolonien waren die Plasmid-Banden sichtbar. In Kolonie 73 (kleine Kolonie) konnte kein Plasmid nachgewiesen werden (roter Rahmen in **Abbildung 3-8**).

3.4.2 BESTIMMUNG DER RATE AN PLASMIDHALTIGEN ZELLEN IM STANDARD

Zur Bestimmung der Anzahl von großen plasmidlosen und kleinen plasmidhaltigen Kolonien in den eingefrorenen Standards wurden Keimzahlbestimmungen auf Standard-I-Blutagar durchgeführt. Anhand dieses Agars konnten große und kleine Kolonien gut unterschieden werden.

Kolonien werden als groß definiert, wenn sie nach 24 Stunden gut sichtbar auf der Blutplatte vorhanden sind. Die kleinen Kolonien sind teilweise auch zu erkennen, die Anzahl der gewachsenen kleinen Kolonien

lässt sich sicher aber erst nach 48 Stunden definieren. Man kann sie zusätzlich auch an einem weißen Zentrum erkennen, das bei den großen Kolonien nicht vorhanden ist (**Abbildung 3-9**).

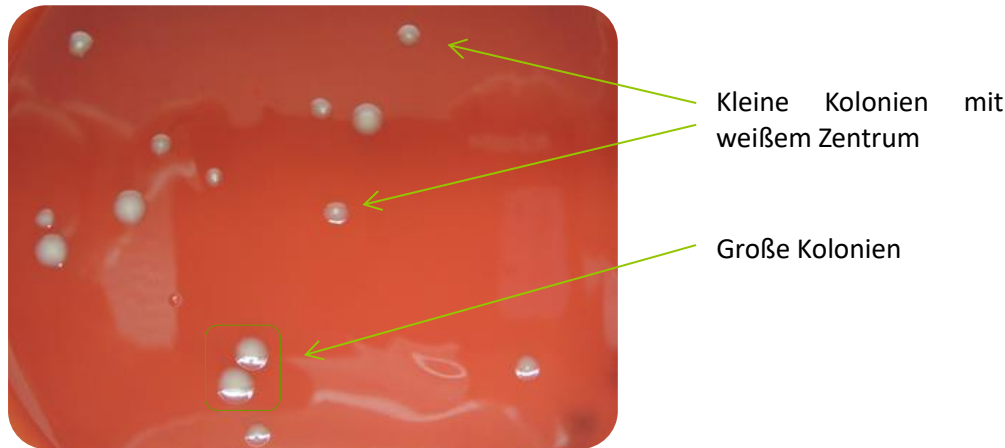


Abbildung 3-9: Blutagarplatte mit großen und kleinen Kolonien aus PEI-A-101-02

Das Verhältnis von großen und kleinen Kolonien lag im Mittel bei 1:12 und wurde aus 9 Differenzierungs-Keimzahlbestimmungen des Standards PEI-A-101-02 errechnet. Die Ergebnisse von sind in **Abbildung 3-10** zusammengefasst. Die Standardabweichung für den Anteil an großen Kolonien wurde mit einem Schwankungsbereich von 1,07% angegeben. Für die kleinen Kolonien lag die Abweichung bei 1,21%. In jedem der hier untersuchten Inokula wurden $\leq 9,5\%$ plasmidlose bzw. große Kolonien gefunden.

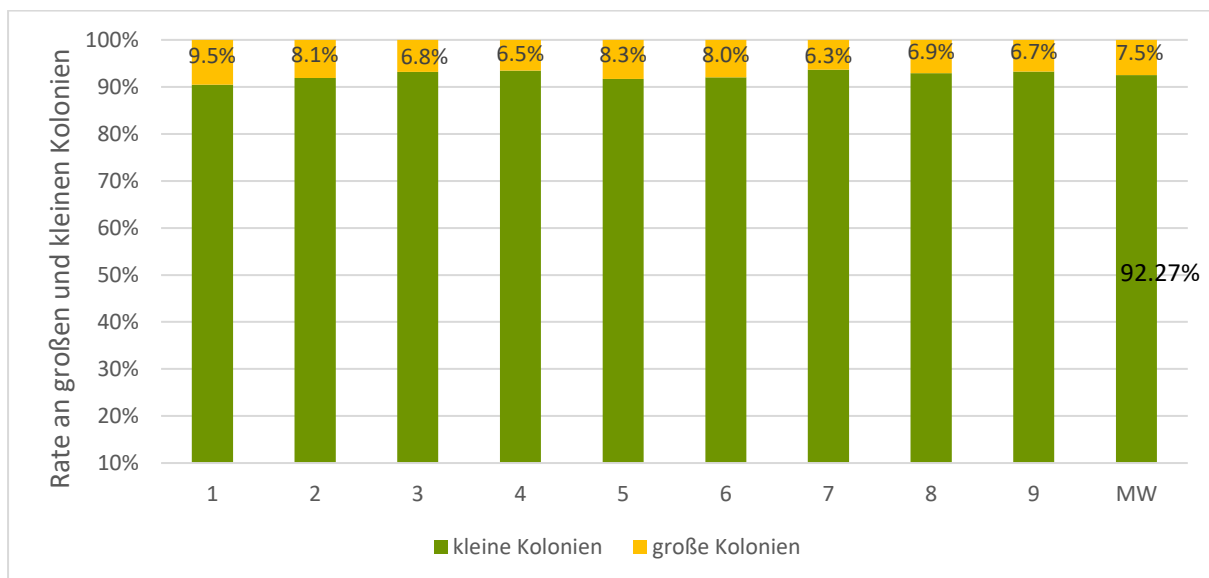


Abbildung 3-10: Verhältnis von großen zu kleinen Kolonien im Standard PEI-A-101-02.

3.4.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Im Versuch (Kapitel 3.4.1) wurden die abgepickten Kolonien auf Plasmidgehalt untersucht. Es wurden 98,7% der kleinen Kolonien plasmidpositiv getestet und bei alle großen Kolonien konnte kein Plasmid nachgewiesen werden. Das Ergebnis des ‚Exakten Tests nach Fisher‘ von $P < 0,0001$ ist signifikant, d.h. durch die kulturelle Differenzierung kann eine Aussage über den auf Plasmidbesitz anhand der Koloniegröße getroffen werden.

TABELLE 3-1: EXTAKTER TEST NACH FISHER ZUR BESTIMMUNG DER BEOBACHTETEN HÄUFIGKEITEN IN DER STICHPROBE

Kolonie		Plasmidbande		Total
Frequency Pct	Row	ja	nein	total
groß		0 0,00%	6 100,00%	6
Klein		76 98,70%	1 1,30%	77
total		76	7	83

Ergebnis: $P < 0,0001$

3.5 WACHSTUM VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA* IN BLUTPRODUKTEN

Um festzustellen, ob *Yersinia enterocolitica* in verschiedenen Blutkomponenten ein geeignetes Wachstumsmilieu findet, wurden definierte Zellzahlen von *Yersinia enterocolitica* inokuliert und unter den in der Hämotherapie-Richtlinien vorgegeben Bedingungen inkubiert. Der Beprobungszeitraum für jeden Versuch ist im jeweiligen Kapitel dokumentiert.

3.5.1 WACHSTUM IN ERYTHROZYTENKONZENTRATEN

Im ersten Schritt wurde das Wachstum von *Yersinia enterocolitica* in zu 50 ml aliquotierten EKs überprüft. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns hatten alle hier verwendeten EKs ihre Haltbarkeit um 1 bis 3 Tage überschritten.

Die inokulierten Keimzahlen sind in den Legenden von

Abbildung 3-11 und **Abbildung 3-12** dokumentiert und liegen zwischen 7,7 und 124 KBE/Beutel. Der

eingesetzte Stamm mit Plasmid gehörte zu der ersten Charge der Standardherstellung (PEI-A-101-01).

Nach einer Adaptionszeit von wenigen Tagen (zwischen Tag 2 und 6 wurden keine Proben genommen) konnte bei PEI-A-101-01 ein Anstieg der Bakterienzellzahl festgestellt werden. Die Komponenten mit den höheren Initialkeimzahlen erreichten nach ≥ 22 Tagen eine Keimzahl von bis zur 10^7 KBE/ml EK (**Abbildung 3-11**).

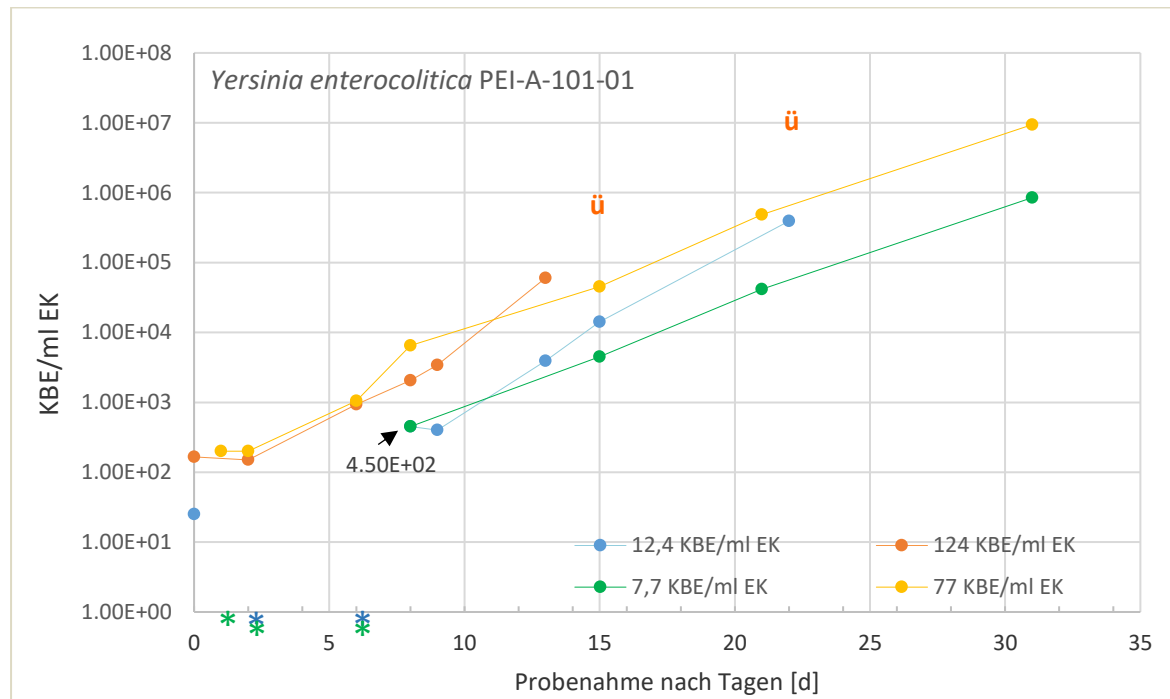


Abbildung 3-11: Wachstum von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101 (plasmidhaltig) in EK mit unterschiedlichen Startinokula. Die roten und blauen bzw. die gelben und grünen Markierungen stellen zwei zeitlich unabhängige Versuchsansätze dar.

(ü =überwachsen, Platte war nicht mehr auszählbar-geschätzte Keimzahl; **kein Koloniewachstum in den ersten 6 Versuchstagen nachgewiesen).

Die Keimzahlbestimmung an Tag 8 ergab bei beiden Ansätzen mit niedrigen Inokulationskeimzahlen übereinstimmende Ergebnisse (Überlagerung der Messpunkte, s. **Abbildung 3-11**). Die Entwicklung der Keimzahlen in den Parallelansätzen mit jeweils einer niedrigen und einer hohen Keimzahl zeigt bei beiden Stämmen einen weitgehend parallelen Verlauf.

Der Stamm ohne Virulenzplasmid (PEI-A-102) erreichte die Keimzahlen im Vergleich später als die pYV positiven Bakterien (**Abbildung 3-12**). Auch hier ist ein parallel verlaufendes Wachstum bei unterschiedlicher Inokulationskeimzahl zu beobachten.

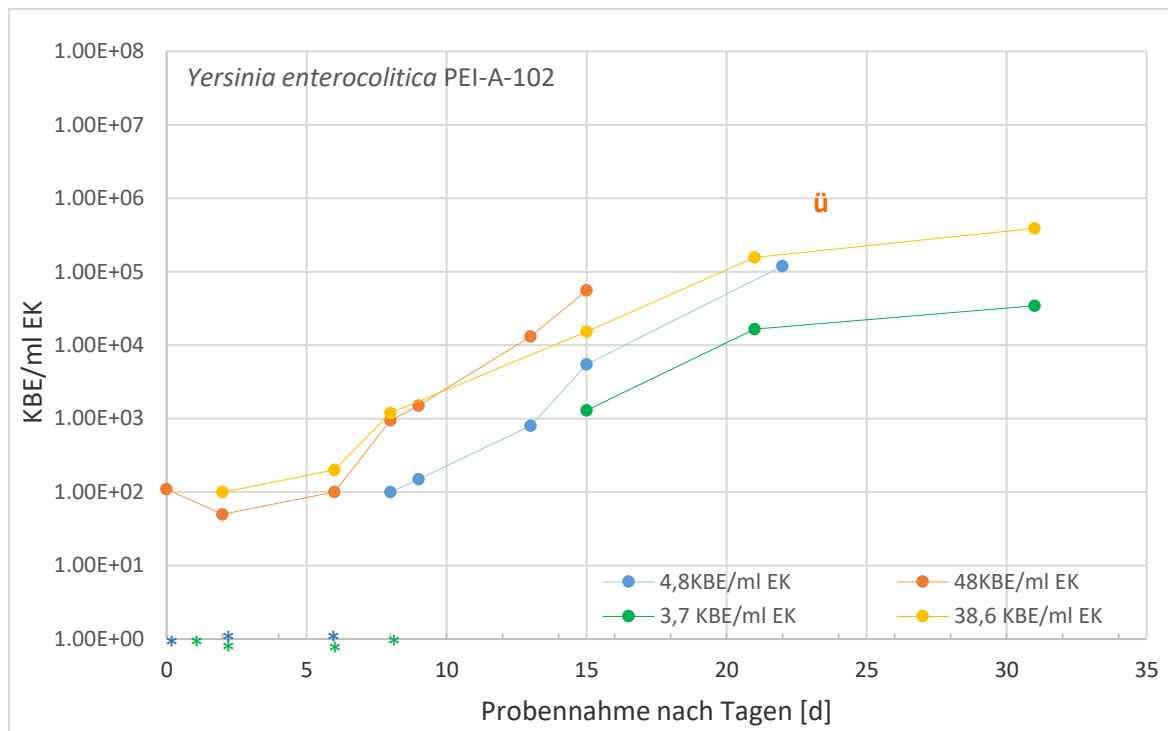


Abbildung 3-12: Wachstum von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-102 (plasmidlos) in EK mit unterschiedlichen Startinokula.

Mit dem plasmidhaltigen Stamm PEI-A-101-02 wurde ein weiterer Wachstumsversuch durchgeführt. Es wurden geringe Zellzahlen von *Yersinia enterocolitica* in 3 EKs mit Volumina von ca. 300 ml inokuliert.

Die Initialkeimzahl von 100 KBE/Beutel war im Vergleich zum Experiment mit 50 ml EK-Volumen (185 und 2400 KBE/Einheit) teilweise deutlich niedriger, was sich auch in der Entwicklung zu Beginn der Beprobung zeigt. Die ersten Probenahmen zeigten kein Wachstum von *Yersinia enterocolitica*. Erst nach ca. einer Woche konnte auf den Nährböden Wachstum nachgewiesen werden.

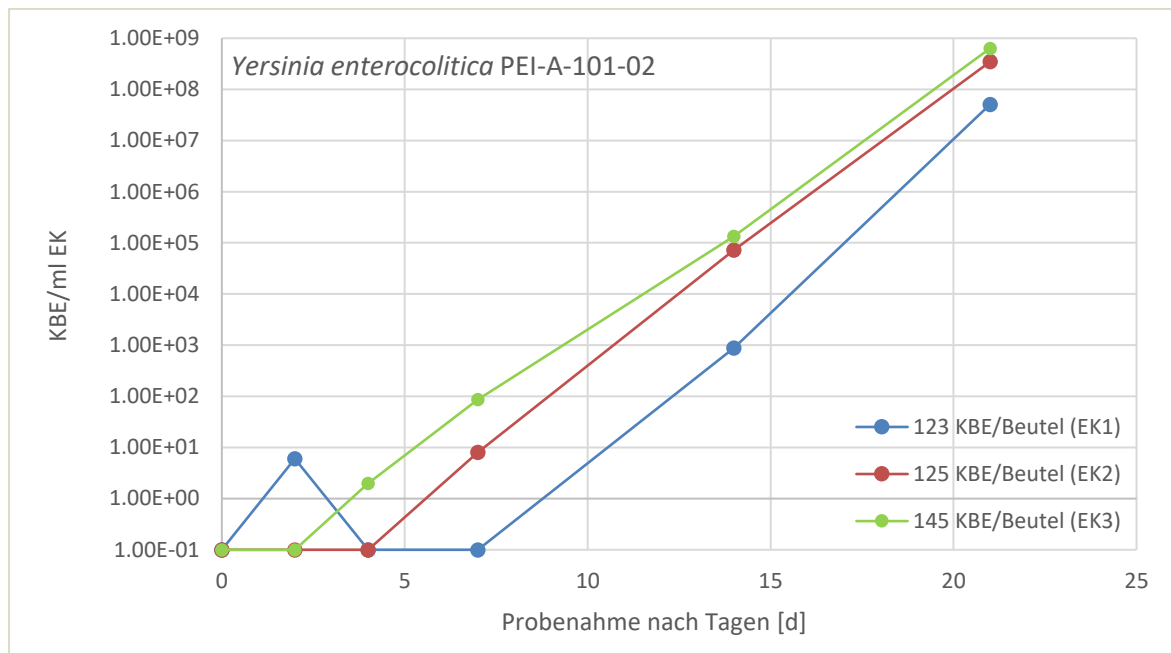


Abbildung 3-13: Entwicklung der Keimzahl von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 in EK bei 4°C.

Nach der Adaptationsphase werden die höchsten Keimzahlen schneller erreicht als bei geringeren EK-Volumina und höherer Initialkeimzahl. Zum gleichen Zeitpunkt lagen die Werte mindestens eine Zehnerpotenz höher als beim ersten Inokulationsexperiment. Der sigmoidale Verlauf der Wachstumskurve ist nicht erkennbar, da die Abstände zwischen den Beprobungen während der logarithmischen Wachstumsphase jeweils mehrere Tage betragen. In allen drei EKs konnte kein Wachstum von *Yersinia enterocolitica* direkt nach Kontamination nachgewiesen werden. An Tag 2 wurden im unverdünnten EK1 drei Kolonien gefunden, dann erst wieder an Tag 14 (8,8 Kolonien in der ersten Verdünnung). EK 3 wies an Tag 4 eine Kolonie in der unverdünnten Probe auf. An Tag 7 wurde sowohl in EK2 eine Kolonie als auch in EK3 bakterielles Wachstum beobachtet. Nach 14 Tagen war in allen EK-Beuteln Wachstum zu verzeichnen. Die Keimzahlen entwickelten sich anschließend schnell. EK3, inokuliert mit 145 KBE/Beutel, konnte nach Versuchsende die höchste Keimzahl verzeichnen. Die Beprobung wurde nach 3 Wochen aufgrund technisch bedingter Probleme bei der Lagerung der eingestellt (**Abbildung 3-13**).

3.5.2 WACHSTUM IN ADDITIVLÖSUNG (PAGGS-M)

Um den Einfluss der verwendeten Additivlösung auf den plasmidhaltigen Stamm PEI-A-101 von *Yersinia enterocolitica* zu untersuchen, wurde die Anzahl an Bakterienzellen in der PAGGS-M Lösung aus Versuch 3.6.2 (Leukozytenfiltration mit der Matrix PAGGS-M) bestimmt, die Additivlösung anschließend bei 4°C

inkubiert und das Wachstum nach zwei und sieben Tagen überprüft. Die Entwicklung der Keimzahl stellt sich in **Abbildung 3-14** folgendermaßen dar:

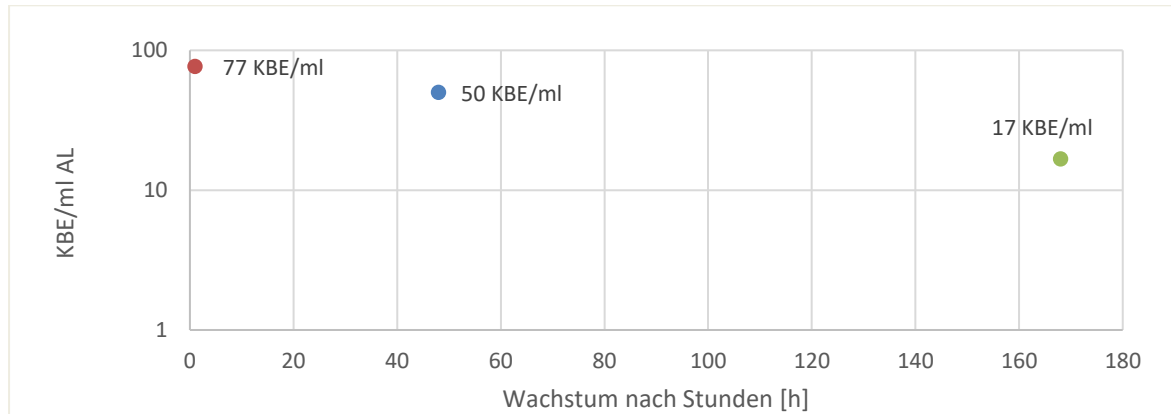


Abbildung 3-14: Wachstum von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101 in PAGGS-M

Wachstum von *Yersinia enterocolitica* konnte in Additivlösung nicht festgestellt werden. Die eingebrachte Keimzahl reduzierte sich im Röhrchen innerhalb von einer Woche um 88%.

3.5.3 WACHSTUM IN THROMBOZYTENKONZENTRATEN

Um das Wachstum in TK festzustellen, wurde in zwei aufeinanderfolgenden Versuchen je ein TK in 50 ml Einheiten aufgeteilt und in Blutbeutel (Fa. Baxter) abgefüllt und kontaminiert. Die Inokulationskeimzahlen sind in **Tabelle 3-2** und betragen zwischen 3,54 und $1,02 \times 10^4$ KBE/ml TK.

TABELLE 3-2: INOKULATIONSKEIMZAHLEN DES PLASMIDHALTIGEN STAMMES PEI-A-101-01

Inokulationskeimzahl (in 1 ml der Verdünnung des Standards)	Volumen TK	Berechnete Keimzahl im TK	Wachstum
185 KBE	50	3,54 KBE/ml TK	nein
1930 KBE	50	35,40 KBE/ml TK	nein
386 KBE	50	7,77 KBE/ml TK	nein
3865 KBE	50	77,70 KBE/ml TK	ja
$6,6 \times 10^5$ KBE	65	$1,02 \times 10^4$ KBE/ml TK	ja

Die Entwicklung der Keimzahlen ist in **Abbildung 3-15** dargestellt. Nur in den Ansätzen mit den Initialkeimzahlen $1,02 \times 10^4$ KBE/ml TK und $7,7 \times 10^1$ KBE/ml TK konnte eine Zunahme der Bakterienzahl festgestellt werden.

Im Beutel mit der Anfangskeimzahl von 77 KBE/ml TK wurde erstmalig nach 15 Tagen trotz mehrmaliger vorheriger Beprobung an den Tagen 1, 2, 6, 7 und 8 eine Keimzahl von $8,75 \times 10^4$ KBE/ml TK nachgewiesen. Eine Lag-Phase von mindestens 8 Tagen kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden. In den Beuteln 7,7 KBE/ml TK (31 Tage beprobt) bzw. 3,54 und 35,4 KBE/ml TK (beprobte bis Tag 23) wurde kein Wachstum festgestellt.

Im Beutel mit der höchsten Keimzahl ($>10^4$ KBE/ml TK) war kein Abfall der Keimzahl zu beobachten, wobei zwischen Tag 1 und 7 keine Beprobung stattfand. Der 7-Tage-Wert der höchsten Keimzahl ist ein Schätzwert, da die Platten überwachsen waren (s. lila Markierung).

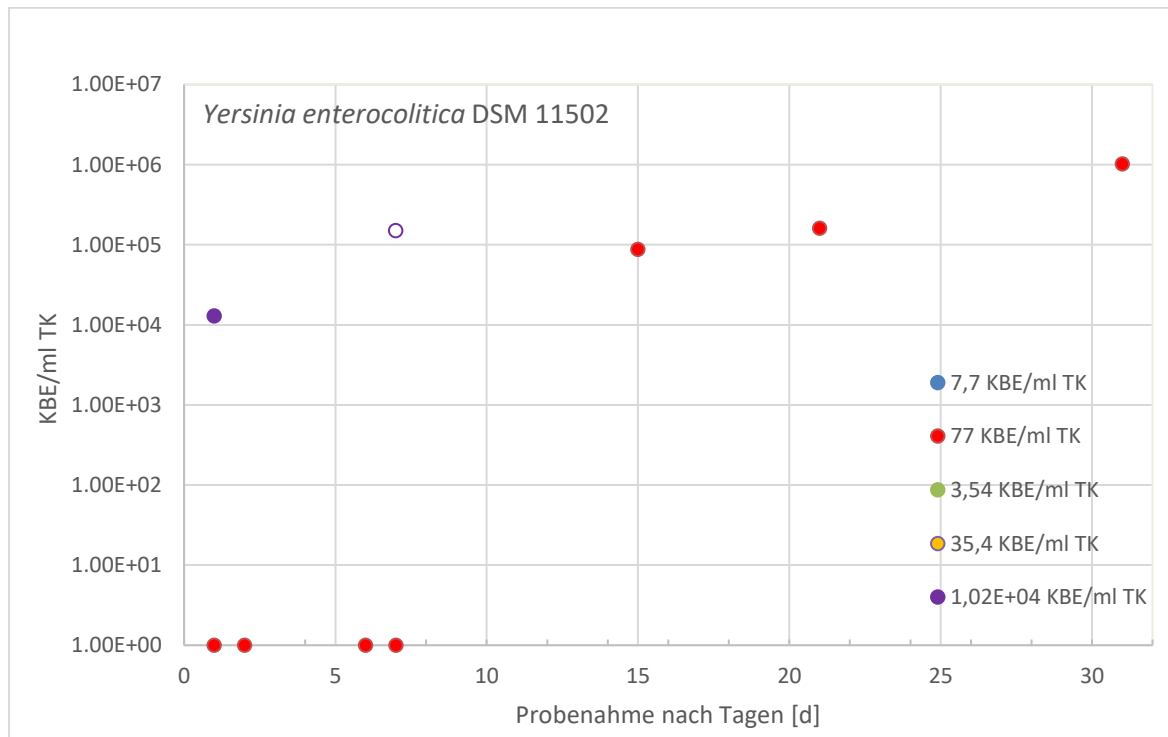


Abbildung 3-15: Wachstum des plasmidhaltigen Stammes von *Yersinia enterocolitica* (PEI-A-101-01) im TK. Die nicht ausgefüllte Markierung ist ein Schätzwert, da die Platten überwachsen waren bzw. nur orientierend ausgezählt wurden.

Der plasmidlose Stamm konnte im TK zu keinem Zeitpunkt (letzte Kontrolle nach 24 Tagen) wiedergefunden werden. Die Kontaminationskeimzahlen sind in **Tabelle 3-3** aufgeführt.

TABELLE 3-3: INOKUATIONSKEIMZAHLEN DES STAMMES PEI-A-102 (OHNE PLASMID)

Inokulationskeimzahl (in 1 ml der Verdünnung des Standards)	Volumen TK	Berechnete Keimzahl im TK	Wachstum
185 KBE	50	3,70 KBE/ml TK	nein
1930 KBE	50	38,60 KBE/ml TK	nein
177 KBE	50	3,54 KBE/ml TK	nein
1770 KBE	50	35,40 KBE/ml TK	nein

3.5.4 WACHSTUM IN FRISCHPLASMA

Zur Wachstumskontrolle von *Yersinia enterocolitica* wurden je 10 ml Plasma in Falcon-Röhrchen (4 Plasmen aus je zwei Spendern) in Doppelbestimmung untersucht. Die Endkeimzahl in den Röhrchen wurde mit 100 KBE/ml berechnet. Eine regelmäßige Trübungskontrolle fand statt, eine Beurteilung zur Feststellung von Keimwachstum war durch die natürliche Trübung des Plasmas allerdings nicht ausreichend möglich. Deshalb wurden nach 7 und 14 Tagen Wachstumskontrollen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden je 100 µl auf 2 Standard-I-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C für 24 bis 48 Stunden inkubiert.

TABELLE 3-4: ERGEBNISSE DER WACHSTUMSKONTROLLE VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA* PEI-A-101-02 (PLASMIDHALTIG) IN PLASMA (N=4) MIT DOPPELBESTIMMUNG

Lagerung bei	PEI-A-101-02	1a	1b	NK1	2a	2b	NK2	3a	3b	NK3	4a	4b	NK4
4°C	7 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	++	++	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	14 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	+++	+++	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RT	7 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	14 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	++	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
37°C	7 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	14 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = kein Wachstum, + = leichtes Wachstum, ++ = mäßiges Wachstum, +++ = starkes Wachstum, NK = Negativkontrolle

Ausschließlich in einem Spenderpool konnte Wachstum festgestellt werden. Bei 4°C war nach 7 Tagen die Platte sehr gut bewachsen (++). Kolonieabgrenzungen waren nur noch schwer zu erkennen. Nach 14 Tagen war ein dichter Zellrasen (+++) auf den Platten zu beobachten.

Bei Raumtemperatur konnte *Yersinia* sich nur in einem der beiden Ansätze vermehren. Nach 7 Tagen waren einige Kolonien gewachsen (+), sie waren gut auszählbar (ca. 30 KBE/Platte). Nach 14 Tagen war die Keimzahl angestiegen und die Kolonien konnten nicht mehr ausreichend differenziert (++) werden. In den

übrigen Plasmen wurde keine Kontamination mehr nachgewiesen (n.n.). *Yersinia enterocolitica* PEI-A-102 (plasmidlos) konnte in Plasma nicht nachgewiesen werden (s. **Tabelle 3-5**).

TABELLE 3-5: ERGEBNISSE DER WACHSTUMSKONTROLLE VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA* PEI-A-102 (PLASMIDLOS) IN PLASMA (N=4) MIT DOPPELBESTIMMUNG

Lagerung bei	PEI-A-102	1a	1b	NK1	2a	2b	NK2	3a	3b	NK3	4a	4b	NK4
4°C	7 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	14 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
RT	7 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	14 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
37°C	7 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	14 Tage	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = kein Wachstum

3.6 ABREICHERUNG VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA* DURCH LEUKOZYTENFILTRATION MIT UNTERSCHIEDLICHEN MATRIZES

Um das Retentionsverhalten von *Yersinia enterocolitica* in speziell für EK-Komponenten konzipierten Filtern zu untersuchen, wurden verschiedene Probenmaterialien mit einer möglichst großen Anzahl von Bakterien inokuliert und über den Filter gegeben. Vor und nach Filtration wurden die Keimzahlen bestimmt. In **Abbildung 3-16** ist die Filterart abgebildet, die auch im VB-Versuch in Springe eingesetzt wurde.



Abbildung 3-16: Verwendete Leukozytenfilter von MacoPharma für die Experimente mit Additivlösung und EK.

EKS während der Inkubationszeit (4h) in Versuch 2 (A). Ein noch unbenutzter Leukozytendepletionsbeutel der Fa. MacoPharma (B).

Da die Leukozytenfiltration mit unterschiedlich behandelten Blutkomponenten, Lösungen und zwei *Yersinia enterocolitica* Stämmen durchgeführt wurde, ist in eine Übersicht der Versuche zu sehen.

TABELLE 3-6: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERSUCHSKOMPONENTEN DER LEUKOZTENFILTRATIONS-EXPERIMENTE

Experiment	Matrix				Stamm	
	NaCl	PAGGS-M	EKf	EK	PEI-A-101-02 (plasmidhaltig)	PEI-A-102 (plasmidlos)
Leukozytenfiltration Nr. 1 (Trockenfilter Fresenius)	x				x	x
Leukozytenfiltration Nr. 2 (Feuchtfiler Macopharma)		x			x	
Leukozytenfiltration Nr. 3 (Trockenfilter Fresenius)			x		x	x
Leukozytenfiltration Nr. 4 (Feuchtfiler Macopharma)				x	x	

3.6.1 LF 1 - LEUKOZYTENFILTRATION MIT DER MATRIX NACL (0,85%)

Die Ergebnisse der drei Parallelansätze (= drei Beutel) mit Stamm PEI-A-102 und dem Trockenfilter von Fresenius Kabi sind in **Abbildung 3-17** dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass für die Bakterien ohne Plasmid ein großer Schwankungsbereich bei der Filtrationsleistung besteht. Da in der Ausgangssuspension eine Keimzahl von ca. 7×10^5 KBE/ml vorlag, die zur Anwendung vorverdünnt werden musste, und die Bakterien in 100 ml NaCl 0,85% für die Filtration inokuliert wurden, lagen die Anfangs-Keimzahlen bei Beginn des Versuchs in einem recht niedrigen Bereich von 8×10^2 KBE/ml bis $1,83 \times 10^3$ KBE/ml.

Die ausgefüllten Säulen zeigen die Keimzahlen vor und nach Filtration. Die Anzahl und Rate der durch den Filter entfernten Bakterienzellen ist in der gestrichelten Säule dargestellt.

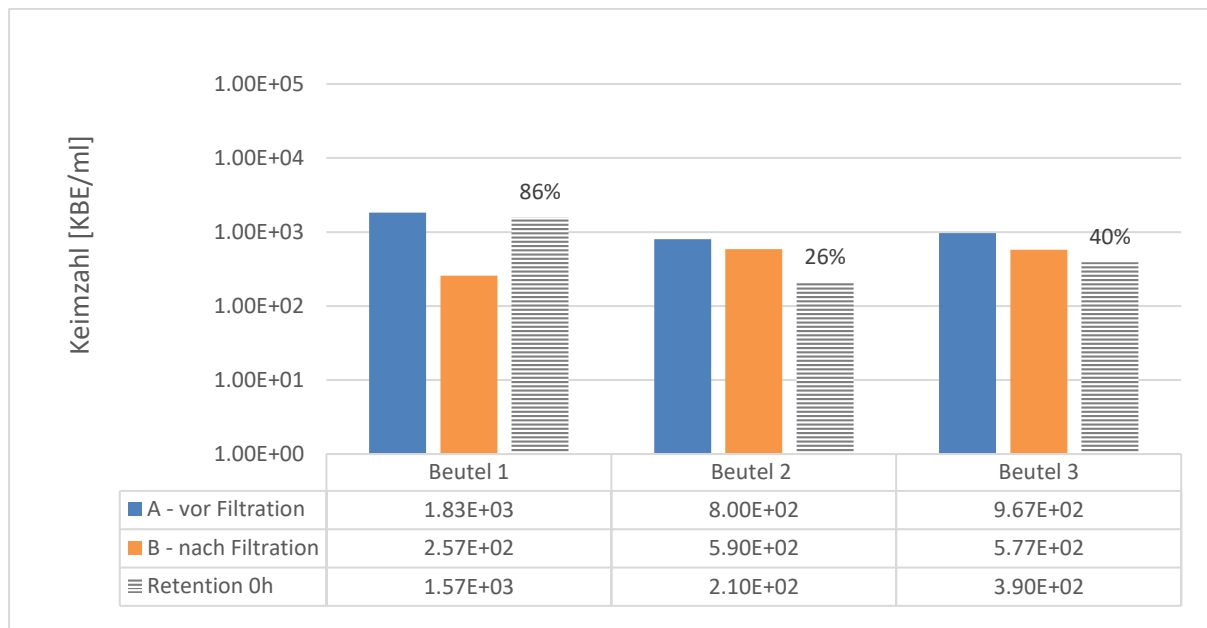


Abbildung 3-17: Retention des plasmidlosen Stammes PEI-A-102 in der Matrix NaCl (n=3).

Im Gegensatz zum plasmidlosen Stamm zeigten die Ergebnisse der Experimente mit PEI-A-101 (plasmidhaltiger Stamm) mit dem Trockenfilter von Fresenius Kabi sehr ähnliche Werte. Es wurden 95% bis 97% der Bakterien im Filter zurück gehalten (**Abbildung 3-18**).

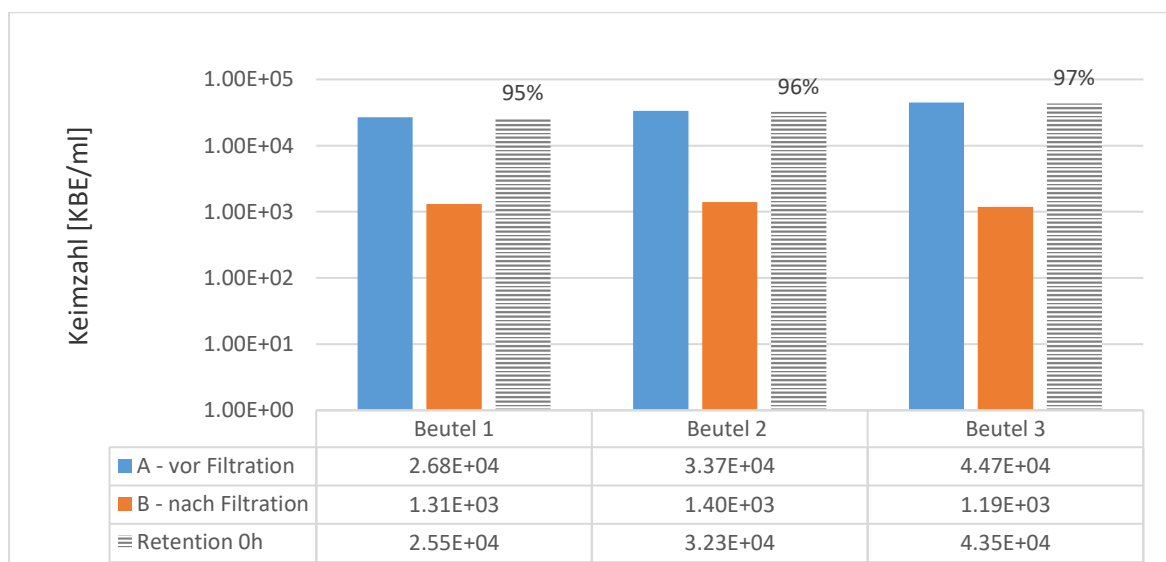


Abbildung 3-18: Retention des plasmidhaltigen Stammes PEI-A-101 in der Matrix NaCl (n=3).

Differenziert man große und kleine Kolonien des Stammes PEI-A-101 und verfolgt die Retention, fällt auf, dass sich im NaCl-Filtrat (s. **Abbildung 3-18** und **Abbildung 3-19**) das Verhältnis von plasmidhaltigen Bakterienzellen (YEP+) und plasmidlosen Bakterienzellen (YEP-) etwas ändert. Im Mittel bestand die Bakteriensuspension aus 8,3% großen, plasmidlosen Kolonien vor Filtration. Nach der Filtration war ein leichter Anstieg auf 12% zu verzeichnen.

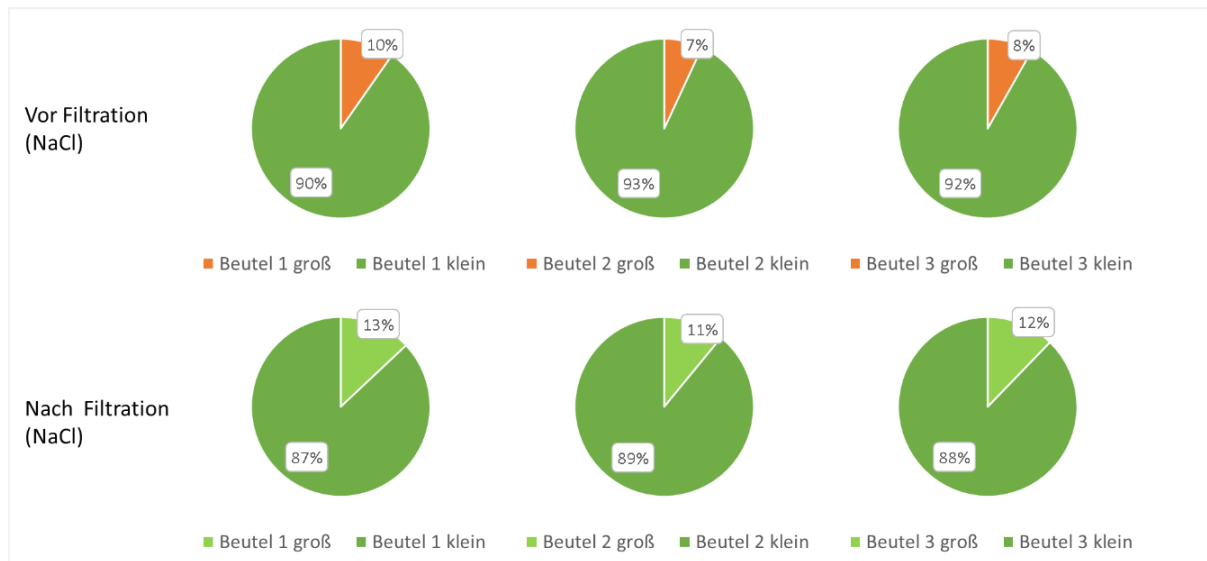


Abbildung 3-19: Anteil von großen und kleinen Kolonien in drei untersuchten Beuteln 1, 2 und 3 vor und nach Filtration in NaCl.

3.6.2 LF 2 - LEUKOZYTENFILTRATION MIT DER MATRIX ADDITIVLÖSUNG (PAGGS-M)

Um die Wechselwirkung des plasmidtragenden Stammes mit dem Filtermaterial bzw. den im EK befindlichen Leukozyten besser einschätzen zu können, wurde die Additivlösung PAGGS-M kontaminiert und mit den Feuchtfiltren von Macopharma filtriert. Es wurden vier Parallelansätze (= vier Beutel) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3-20** zu sehen.

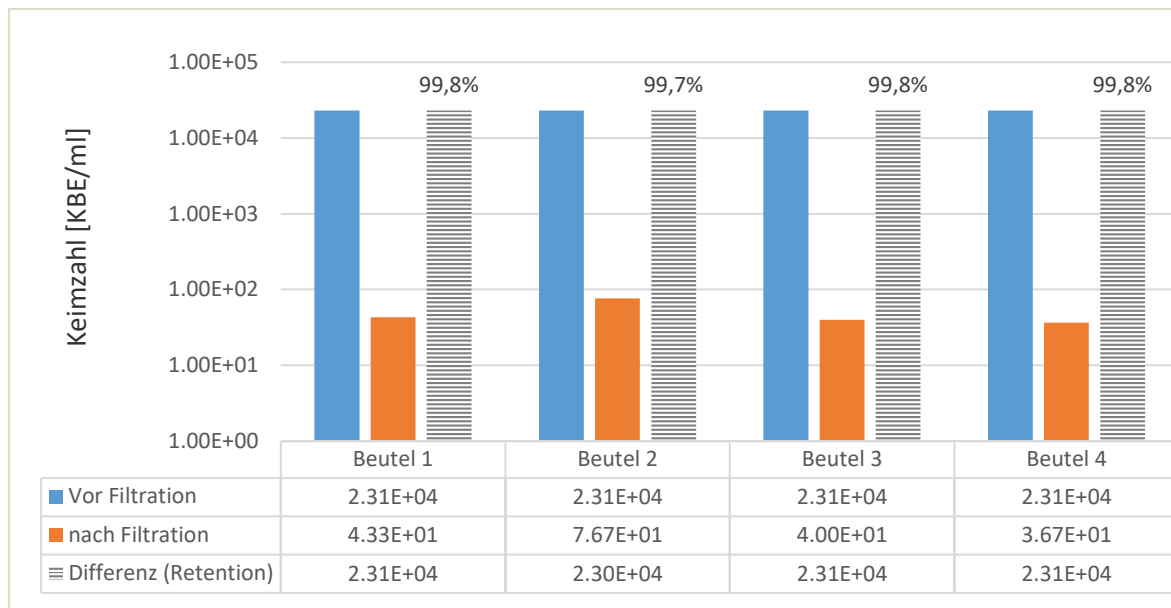


Abbildung 3-20: KBE von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 in Additivlösung (n=4) vor und nach Filtration mit dem Macopharma Filter. Die Filtration reduzierte die KBE um mindestens 99,7%.

Die *Yersinia*-Zellen wurden im feuchten Macopharma-Filter fast vollständig zurückgehalten. Die Retentionszahlen lagen im Mittel bei 99,8% anstatt bei 97% in NaCl für den Trockenfilter von Fresenius. Die Initialkeimzahlen lagen in der gleichen Größenordnung.

Auch hier wurde die Koloniegröße auf Standard-I-Blutagarplatten zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl differenziert, aber ein sehr inhomogenes Ergebnis beobachtet. Zwei der vier Beutel zeigten eine erhöhte Rate an zurück gehaltenen YEP+ Zellen nach der Filtration, bei den übrigen Beuteln konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Keimzahlen nach Filtration waren allerdings so gering, dass auf allen Agarplatten durch das geringe Probenvolumen von 100 µl im Mittel (n=3) weniger als 10 Kolonien wuchsen und der statistische Fehler dadurch sehr hoch war (**Abbildung 3-21**).

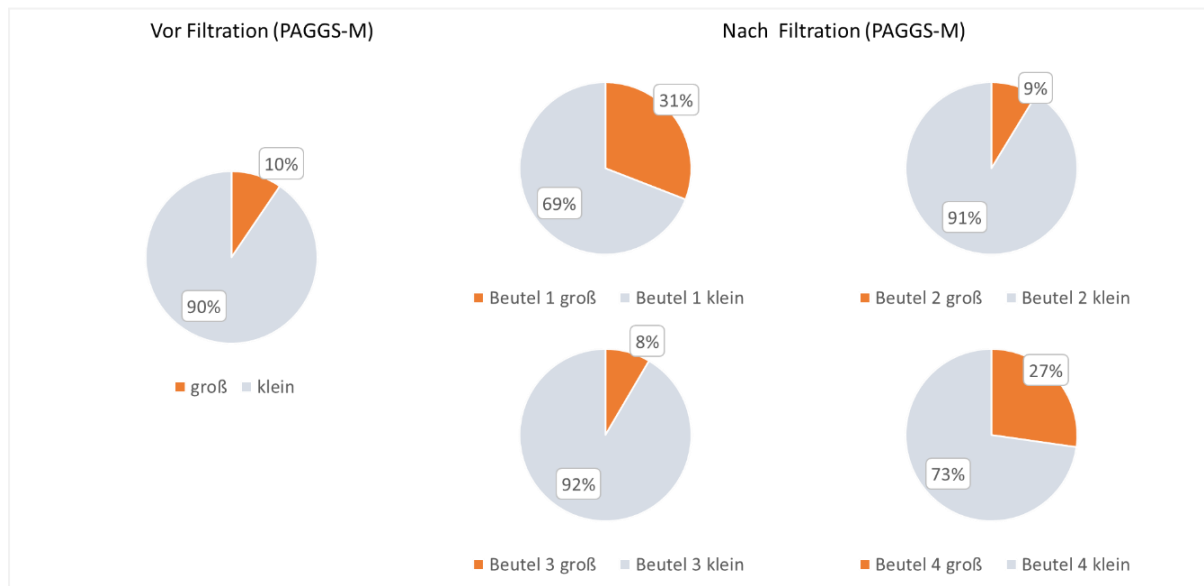


Abbildung 3-21: Anteil von großen und kleinen Kolonien in der Additivlösung PAGGS-M vor und nach Filtration mit dem Macopharma Filter.

3.6.3 LF 3 - LEUKOZYTENFILTRATION MIT LEUKOZYTENDEPLETIERTEM ERYTHROZYTENKONZENTRAT

Um das Adhäsionsverhalten von *Yersinia enterocolitica* im Erythrozytenkonzentrat in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu untersuchen, wurden je 100 ml leukozytenfiltriertes EK (am Ende bzw. außerhalb der Lagerzeit) mit beiden *Yersinia enterocolitica*-Stämmen kontaminiert (Beutel A). Für den plasmidlosen Stamm betrug das Inokulum 7×10^4 KBE/ml, für den virulenten Stamm 2×10^6 KBE/ml. Abweichend von der in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Vorgehensweise wurde zusätzlich nach der Filtration der ersten Hälfte der im Beutel A verbliebene Rest für vier Stunden bei Raumtemperatur gelagert und anschließend durch einen weiteren Filter geleitet (Schritt 2, **Abbildung 2-14**). Vor (Beutel A_{4h}) und nach Filtration (Beutel B_{4h}) wurde eine Keimzahlbestimmung aus dem EK durchgeführt.

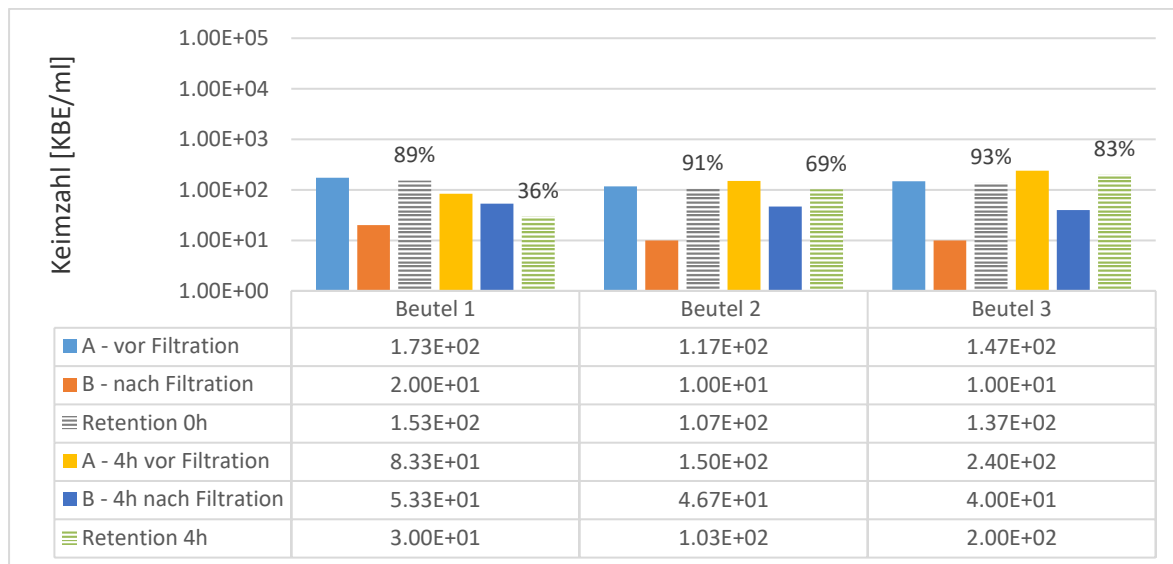


Abbildung 3-22: KBE von leukozytendepletiertem EK kontaminiert mit plasmidlosem Stamm PEI-A-102 nach 0h und 4h Inkubation und nach Filtration mit dem Trockenfilter von Fresenius Kabi (n=3).

In Beutel 1 des Experiments mit dem plasmidlosen Stamm PEI-A-102 war das EK-Volumen in Beutel B_{4h} (Filtrat) so gering, dass eine ordnungsgemäße Probenahme nicht durchgeführt werden konnte. Der Filter wurde mit NaCl nachgespült, um den im Filter verbliebenen Rest in den Beutel B zu spülen (**Abbildung 3-22**).

In **Abbildung 3-23** ist die Entwicklung der Keimzahl von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 (plasmidhaltig) vor und nach Leukozytenfiltration in EK mit und ohne Inkubationszeit von vier Stunden im Dreifachansatz gezeigt.

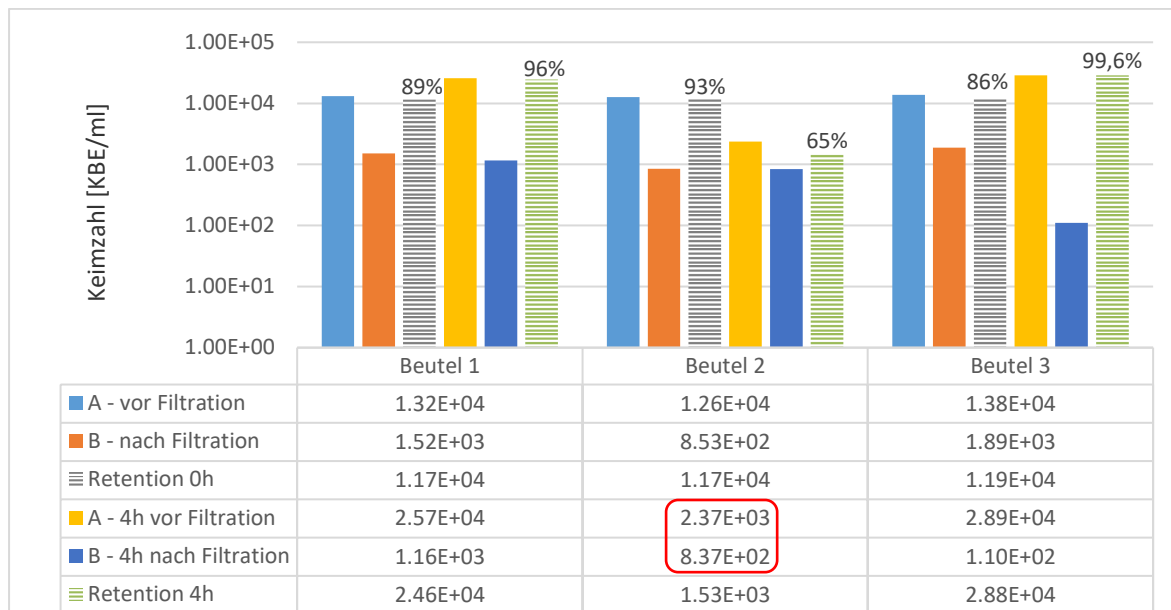


Abbildung 3-23: KBE von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 vor und nach Filtration in der Matrix EKf nach 0 und 4 h Inkubationszeit.

Die Werte der umrandeten Balken vor und nach Filtration wurden vertauscht. Wahrscheinlich hat eine Verwechslung bei der Auszählung der Keimzahl stattgefunden. Die gestrichelten Balken sind die Retentionswerte (n=3).

Die Gesamtkeimzahl in allen drei Beuteln reduzierte sich durch die Filtration um fast eine log-Stufe ohne Inkubationszeit. Vor der Inkubationszeit hatte Beutel 2 die beste Retentionsrate. In zwei von drei Beuteln konnte nach einer Inkubationszeit von vier Stunden eine erhöhte Retention von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101 gegenüber der Filtration direkt nach Kontamination beobachtet werden. Nach vier Stunden wurde nur in Beutel 2 eine verminderte Retention detektiert. Die Keimzahl war hier nach der Lagerung bei RT über vier Stunden vor Filtration um fast eine log-Stufe reduziert. In den anderen beiden inkubierten Parallelansätzen (Beutel 1 und Beutel 3) konnte eine Zunahme um 100% an lebenden Zellen registriert werden.

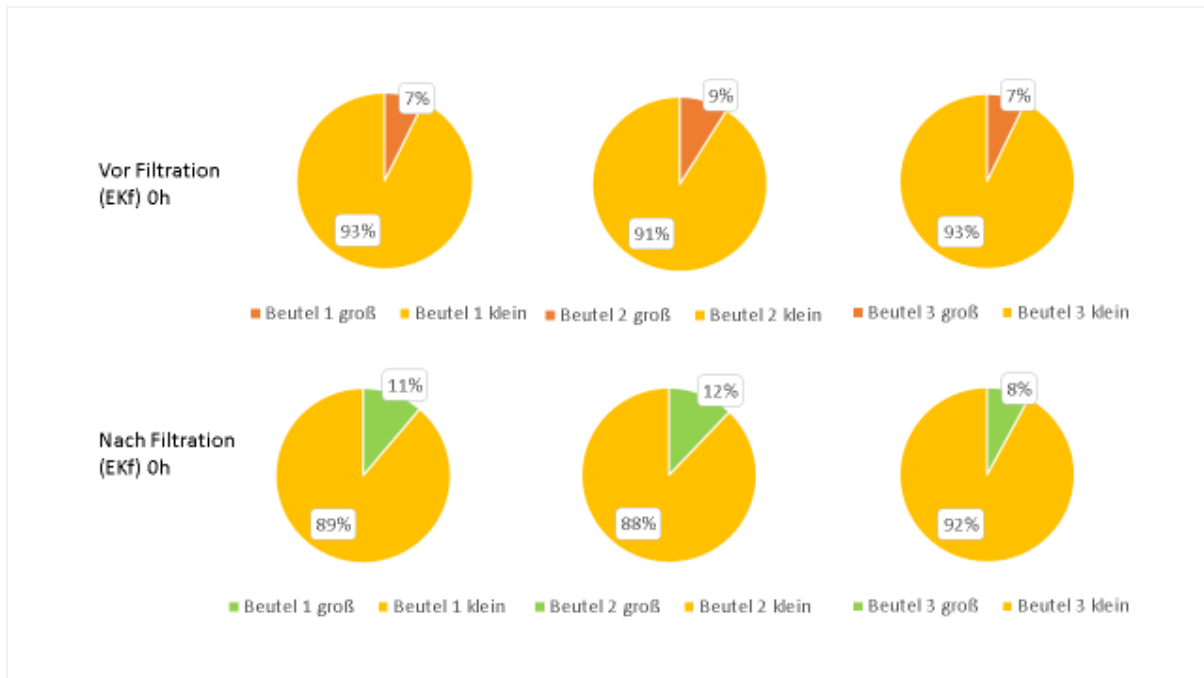


Abbildung 3-24: Anzahl der großen plasmidlosen und kleinen plasmidhaltigen Kolonien direkt vor und nach Filtration ohne Inkubationszeit in der Matrix EKf im Standard PEI-A-101

Bei der Auszählung der Agarplatten wurde das Verhältnis an großen und kleinen Kolonien bestimmt. In **Abbildung 3-24** ist eine leicht erhöhte Anzahl an großen Kolonien nach Filtration zu erkennen.

Nach 4 Stunden Inkubationszeit konnte in Beutel 2 vor Filtration eine deutliche Zunahme der großen, plasmidlosen Kolonien von 9% auf 25% beobachtet werden (**Abbildung 3-25**). In den Beuteln 1 und 3 lag der Anteil an plasmidlosen Bakterien vor Depletion unverändert bei 7%. In diesen Ansätzen ist nach diesem Inkubationszeitraum eine deutlich schlechtere Retention der plasmidnegativen Zellen zu erkennen, obwohl sich in diesen Beuteln nach 4h die Keimzahlen verdoppelt hatten und das Verhältnis von groß zu klein vor und nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden nicht verändert war.

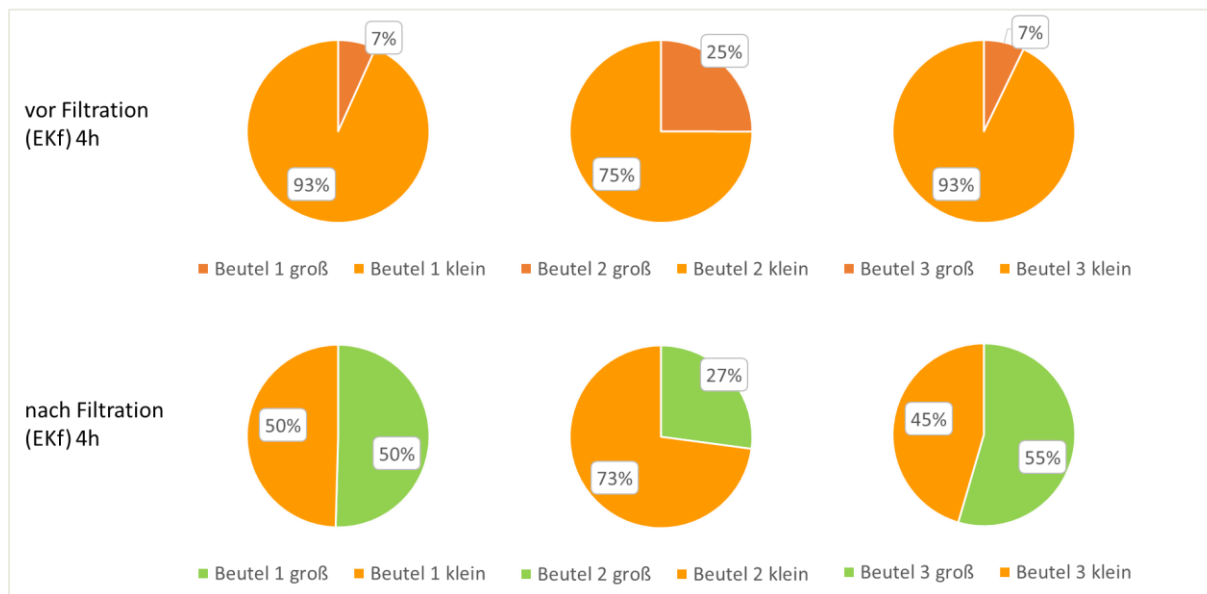


Abbildung 3-25: Anteil der großen plasmidlosen und kleinen plasmidhaltigen Kolonien vor und nach Filtration mit 4h Inkubationszeit in der Matrix EKf.

3.6.4 LF 4 - LEUKOZYTENFILTRATION MIT NICHT LEUKOZYTENDEPLETIERTEM ERYTHROZYTENKONZENTRAT

Es wurden frische, nicht leukozytendepletierte EKs (Volumen ca. 300 ml) verwendet. Nach der Herstellung wurden sie bis zum Versuchsbeginn gekühlt (Versuch 1: bei 4°C max. 48h, Beutel 1 bis 4) oder bei Raumtemperatur (Versuch 2: max. 24h, Beutel 5-8) gelagert. Die Kontaminationskeimzahlen der eingesetzten verdünnten Standards (Stamm PEI-A-101-02) wurden bestimmt. Im Versuch 1 wurde eine Keimzahl von ca. $1,3 \times 10^7$ KBE/ml inokuliert. Die Keimzahl des Inokulums von Versuch 2 wurde mit $1,7 \times 10^7$ KBE/ml berechnet. Da sich die Volumina der EKs unterschieden, wurde nach Inokulation eine weitere Keimzahlbestimmung jedes Beutels durchgeführt. Diese Werte sind in **Abbildung 3-26** (A – vor Filtration) aufgeführt. Im Anschluss wurde die Hälfte der kontaminierten EKs filtriert, eine Keimzahlbestimmung des Filtrats durchgeführt, der Rest im Beutel bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert, durch einen weiteren Filter geleitet und abschließend eine Keimzahlbestimmung des zweiten Filtrats durchgeführt. Es wurde nach Schritt 1 und 2 (s. **Abbildung 2-14**) gearbeitet, wobei die Filter von Beutel 5-8 nicht gewechselt wurden, sondern für den gesamten Beutelinhalt nur ein Filter zur Verfügung stand (es wurde lediglich ein neuer Beutel unterhalb des Filters angeschweißt). Die Retentionsraten der Bakterien waren in den Beuteln 1 bis 4 sehr hoch und lagen bei fast 100%. Im zweiten Versuchsdurchgang

mit Beutel 5 bis 8 konnten vor 4-stündiger Inkubation 98,3% der Bakterien abgefangen werden. Nach wiederholter Verwendung des Filters waren es im Mittel nur noch 94,6%.

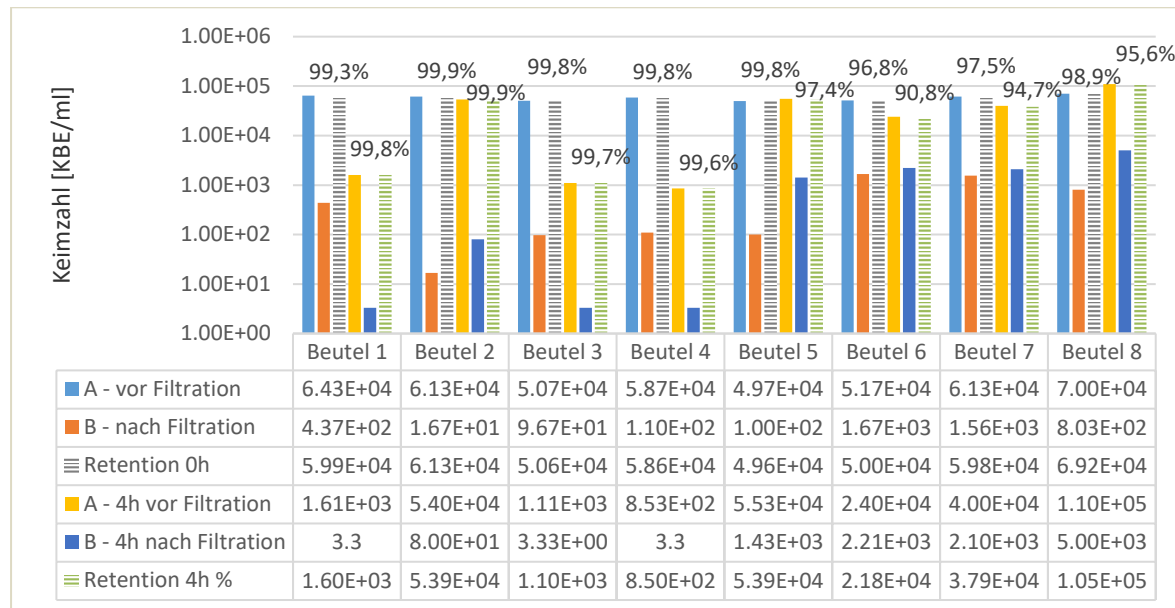


Abbildung 3-26: KBE von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 in unfiltrierten und filtrierten EK (n=8) und nach 4 h Inkubation (Filtermaterial von Macopharma).

3.7 VERTEILUNG VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA* NACH FRAKTIONIERUNG DES VOLLBLUTES (VF)

Die Wiederfindung der Bakterien in den Komponenten erfolgte in zwei Teilschritten. Nach der Kontamination von Vollblut und der sich anschließenden Zentrifugation wurden die entstandenen Schichten auf bakterielles Wachstum untersucht. Die Buffy-Coat Schicht war für die Herstellung von TK zu dünn und konnte nicht weiter verarbeitet werden. Um die Verteilung der Bakterien im weiteren Verlauf zu untersuchen, wurden Buffy-Coats vom BSD bezogen und nach Inokulation von *Yersinia enterocolitica* weiter verarbeitet.

3.7.1 HERSTELLUNG VON EK UND PLASMA (VF NR.1)

Von je drei Spendern wurde vier Falcon-Röhrchen mit Vollblut befüllt und kontaminiert, zentrifugiert und die Schichten auf bakterielle Verteilung untersucht. Im ersten Durchgang wurde mit einer Keimzahl von ca. 1×10^3 KBE pro Milliliter Vollblut beimpft. In den daraus gewonnenen Komponenten wurden keine

Bakterien gefunden. Eine Aussage über die Verteilung konnte somit nicht getroffen werden. In der Wiederholung betrug die Keimzahl pro ml VB bei $2,33 \times 10^5$ KBE.

Insgesamt waren in VB_{0h} bei Spender 1 und 2 im Mittel ein prozentualer Anteil von 0,12% der initial eingebrachte Bakterien zu finden, was einer Reduktion von drei log₁₀-Stufen entspricht. Bei Spender 3 wurde eine geringere Abnahme um ca. 25% der inokulierten Bakterienzellen festgestellt. Nach vier Stunden Inkubationszeit konnte jedoch in allen VB-Proben eine weitere deutliche Reduktion der Keimzahl beobachtet werden. Das Vollblut von Spender 3 konnte die Keimzahl um drei weitere 3 log-Stufen reduzieren, erreichte aber die Keimzahlen der Vollblute 1 und 2 nicht.

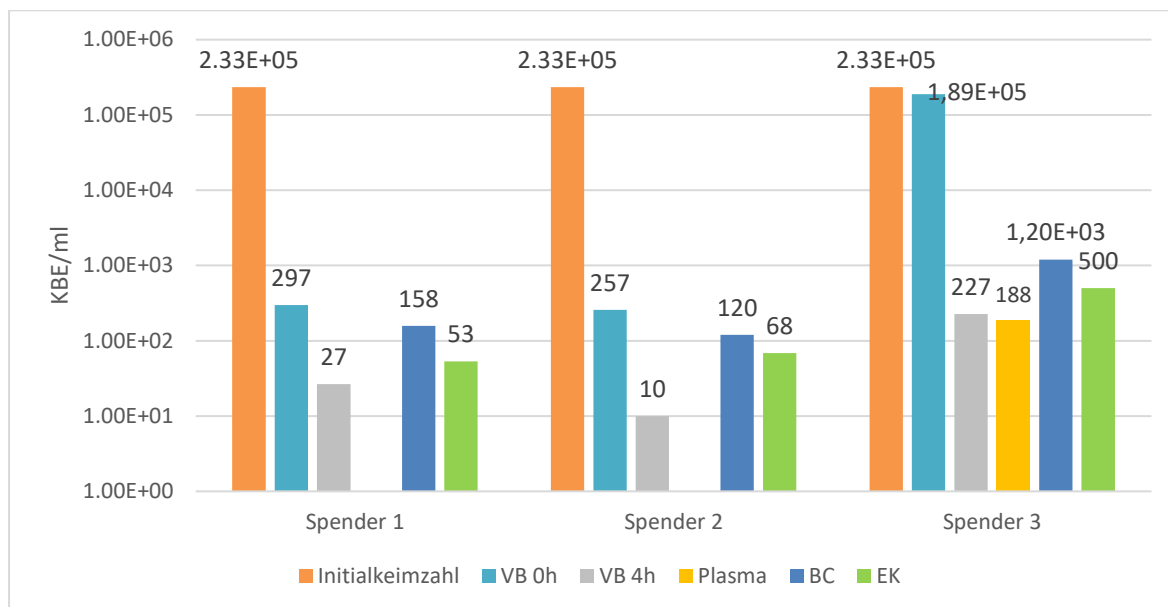


Abbildung 3-27: Nachweis von *Yersinia enterocolitica* in Vollblut und den danach aufgetrennten Komponenten (VB= Vollblut, BC= Buffy Coat, EK= Erythrozytenkonzentrat), n=4 Parallelansätze jedes Spenders.

Bei Spender 1 und Spender 2 war nach der Zentrifugation und anschließender Keimzahlbestimmung kein bakterielles Wachstum im Plasma zu finden (**Abbildung 3-27**). Im Plasma von Spender 3 konnten noch 188 KBE/ml gefunden werden. Im Buffy Coat der Spender 1 und 2 lag der Anteil noch vorhandener Bakterien bei 0,06%. In der EK-Komponente wurden im Mittel noch 0,026% der initial eingebrachten *Yersinia* Zellen wiedergefunden.

3.7.2 HERSTELLUNG VON TK AUS BUFFY-COAT (VF NR. 2)

Zur Herstellung der TK-Fraktion wurden drei Buffy Coats (ca. 50 ml pro Beutel) in je 4 Falcon-Röhrchen verteilt und mit $1,75 \times 10^5$ KBE/ml von PEI-A-101-02 kontaminiert. Nach der Zentrifugation wurden die entstandenen Phasen (TK und Buffy Coat Rest) auf Wachstum untersucht. Auch der Buffy-Coat wies noch sehr gute bakterienreduzierende Eigenschaften auf. Die Reduktion von fast 2 \log_{10} -Stufen war bei allen Spendern deutlich sichtbar. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden war die Bakterienzahl so niedrig, dass auf Standard-I-Agar nur noch sehr wenige Kolonien gefunden wurden. Im TK war die Reduktion der Bakterienzahlen am deutlichsten zu sehen (**Abbildung 3-28**).

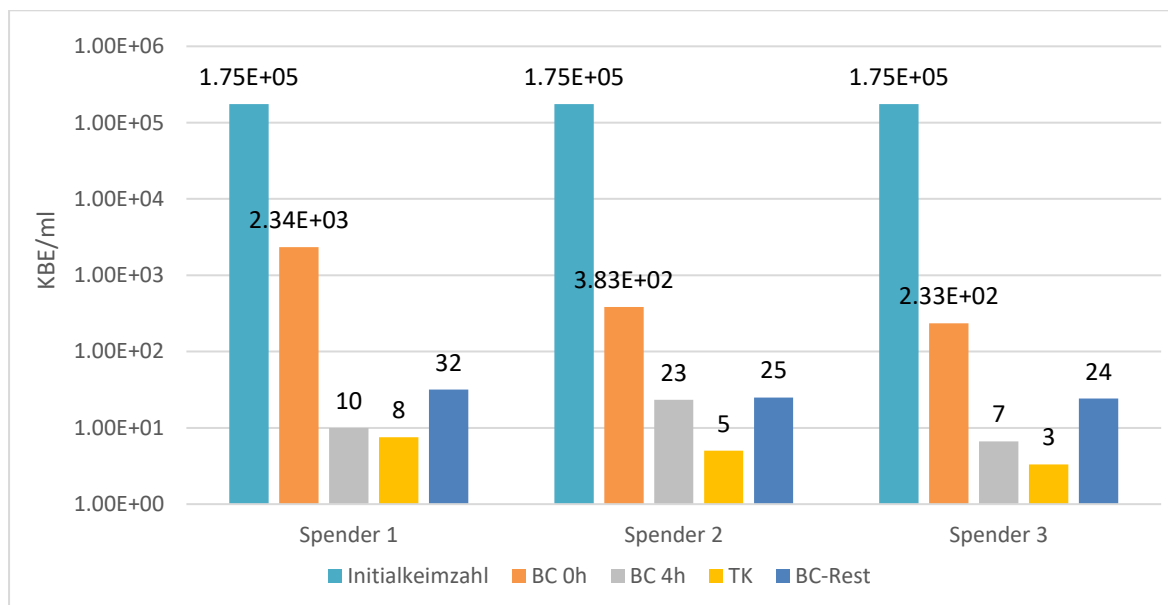


Abbildung 3-28: Verteilung der Bakterien im Buffy-Coat und nach anschließender Auftrennung, n=4 Parallelansätze/Spender in Falconröhrchen.

3.8 DARSTELLUNG VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA* IN EINER VOLLBLUTSPENDE

Um Aussagen über das Wachstumsverhalten der ausgewählten Bakterienstämme im Vollblut bzw. in den einzelnen Komponenten machen zu können, wurde in zwei Versuchsansätzen mit *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 kontaminiert, das Vollblut in die Blutkomponenten aufgetrennt und auf Keimwachstum untersucht. Die positiven Ergebnisse wurden anhand der Gramfärbung der Re-Isolate (s. **Abbildung 3-29**) und des API-Tests (**Abbildung 3-30**) verifiziert.

3.8.1 VOLLBLUT-VERSUCH VB NR. 1 (EIN VOLLBLUT)

Eine Vollblutspende wurde nach Eintreffen in den Blutspendedienst mit einem Milliliter des unverdünnten plasmidhaltigen Teststammes PEI-A-101-02 kontaminiert, für Keimzahlbestimmungen beprobt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut die Keimzahl bestimmt. Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen sind in **Tabelle 3-7** zu sehen. Im Anschluss daran wurde das Vollblut in die Komponenten aufgetrennt und je eine Hälfte unfiltriert und leukozytendepletiert gelagert.

TABELLE 3-7: ERGEBNISSE DER KEIMZAHLBESTIMMUNGEN IM VOLLBLUT VOR SEPARATION

errechnete Keimzahl des eingesetzten Standards	2,62x 10 ⁷ KBE/ml Standard
Keimzahl im VB direkt nach Kontamination	2,48x 10 ⁵ KBE/ml Vollblut
Keimzahl im VB 12h nach Kontamination	Kein Wachstum nachweisbar

In **Tabelle 3-8** ist das Bakterienwachstum in den Blutkomponenten im Beprobungszeitraum von 20 Tagen dargestellt. In den filtrierten Komponenten und im GFP konnte kein Wachstum von *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen werden.

TABELLE 3-8: ÜBERSICHT WACHSTUMSERGEBNISSE DER KOMPONENTEN AUS KONTAMINIERTEM VOLLBLUT.

	0	1	2	3	Sa	So	6	7	8	9	Fr	Sa	So	13	14	15	16	Fr	Sa	So	20	
EK	x	x	x	x			x	x	x	x				x	x	x	x					x
EK filtriert	x	x	x	x			x	x	x													x
TK	x	x	x	x			x	x						x								x
TK filtriert	x	x	x	x			x	x														x
GFP	x	x	x	x			x	x														x

x = kein Wachstum x = Wachstum x = BacT/ALERT positiv, Ausstrich negativ

Aufgrund des größeren Volumens wurden an den jeweiligen Tagen EK- und Plasmaproben in Blutkulturflaschen und TK auf Agarplatten kultiviert. Die Kulturflaschen der inokulierten Proben der unfiltrierten Bestandteile waren bei jeder Messung positiv. Der Ausstrich ergab durchgehend Wachstum von *Yersinia enterocolitica*. Am Ende des Versuchs wurden alle noch negativen Komponenten im

Kulturautomaten (Probenvolumen 10 ml, aerobe Kultivierung) überprüft. Einen Überblick gibt **Abbildung 3-31**.

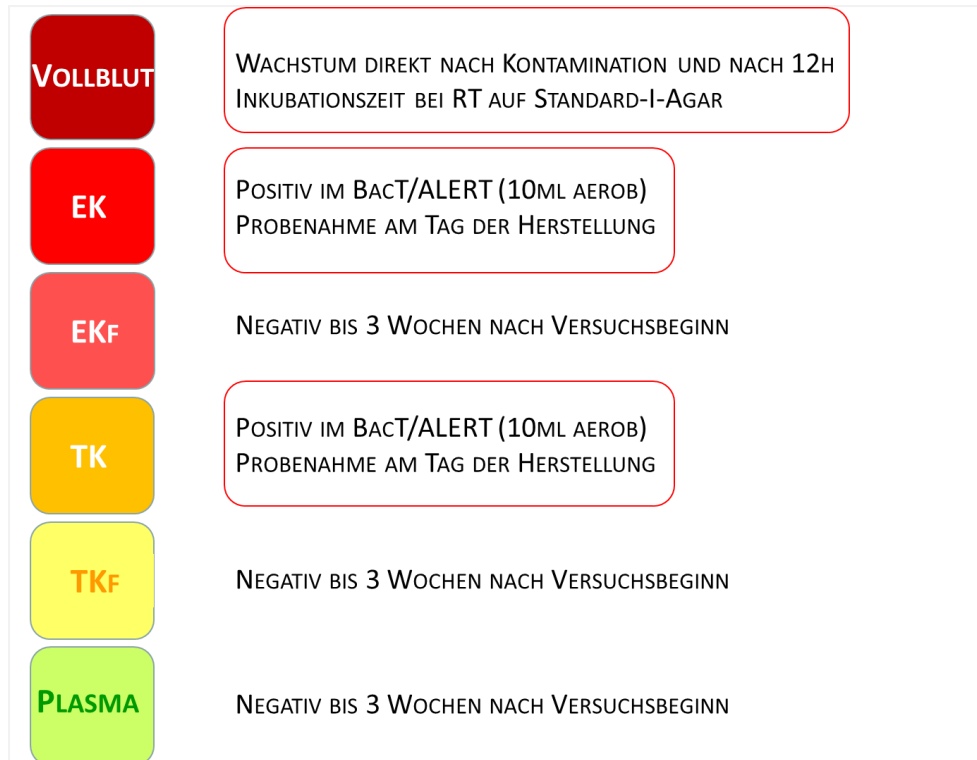


Abbildung 3-31: Ergebnisse des kontaminierten Blutes und der einzelnen Komponenten im Überblick. In den unfiltrierten Blutkomponenten EK und TK konnte direkt am Tag der Herstellung, also am Tag nach der Kontamination Wachstum von *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen werden.

3.8.2 VOLLBLUT-VERSUCH VB NR. 2 (18 VOLLBLUTE)

Versuch II wurde in drei Ansätze eingeteilt. Diese unterschieden sich entweder in Inokulationskeimzahl oder Plasmidbesitz. Je zwei blutgruppenidentische Vollblute wurden gepoolt und zu gleichen Volumina (ca. 500 ml) zurück in die Ursprungsbeutel überführt, um identische Ausgangsbedingungen für parallel hergestellte unfiltrierte (EK) bzw. leukozytenabgereicherte (EKf) Komponenten zu erreichen und deren Ergebnisse vergleichen zu können (s. 2.8.6 , **Abbildung 2-9**, **Abbildung 2-10**). Die gemeinsam gepoolten Beutel wurden identisch mit fortlaufenden Buchstaben beschriftet, wobei die unfiltrierte Komponente den Zusatz 1, die leukozytenfiltrierte Komponente den Zusatz 2 erhielt. Die eingebrachten Keimzahlen, ermittelt durch die Keimzahlbestimmung der hergestellten Verdünnungsstufen, sind in **Tabelle 3-9** dokumentiert. In der Spalte ‚Ergebnis der KBE‘ sind die im unverdünnten Standard vorhandene Anzahl an Bakterien aufgeführt, die durch die initiale Keimzahlbestimmung errechnet wurden. Daraus ergibt sich die

tatsächlich inokulierte Keimzahl pro Beutel in der Tabellenspalte ganz rechts: für die Beutel A bis C wurden 216 KBE/ml, für D bis F 221 KBE/ml und für G bis I 0,02 KBE/ml Vollblut bei einem angenommenen Volumen von 500 ml Vollblut pro Beutel inokuliert. Die Vollblute hatten Füllvolumina über 500g. Ein Nachweis durch das Ausstrichverfahren wäre theoretisch zumindest bei den hohen Inokulationskeimzahlen möglich gewesen.

TABELLE 3-9: ZUORDNUNG DER STÄMME UND INITIALKEIMZAHLEN UND TATSÄCHLICHER INOKULIERTER KEIMZAHL

Ansatz	Beutel	<i>Yersinia enterocolitica</i> Stamm	Ergebnis der KBE [KBE/ml]	Inokulierte Keimzahl [KBE/Beutel]
1	A bis C	PEI-A-102 (pYV ⁻)	7,57x 10 ⁵	1,08x 10 ⁴
2	D bis F	PEI-A-101 (pYV ⁺)	2,7x 10 ⁷	1,10x 10 ⁴
3	G bis I	PEI-A-101 (pYV ⁺)	2,21x 10 ⁷	1,10x 10 ¹

Im ersten Ansatz mit dem plasmidlosen Stamm von *Yersinia enterocolitica* wurden bei der Herstellung der leukozytendepletierten EKs irrtümlich alle Komponenten filtriert, obwohl eines der beiden EKs zum Vergleich dienen sollte. Als es bemerkt wurde, waren beide Beutel B bereits komplett filtriert. Die Beutel A und C enthielten noch ca. die Hälfte des unfiltrierten EKs. Einer der beiden Beutel von A und C wurden in der Filtration gestoppt. Das verbliebene unfiltrierte Volumen war ausreichend um die Probenahme zu beenden.

In der folgenden **Tabelle 3-10** sind die Ergebnisse aus allen 9 Ansätzen A bis I bzw. 18 Spendern aufgeführt. Jeweils 10 ml Probe wurden in aerobe BacT/Alert-Flaschen inokuliert und bei 37°C inkubiert.

TABELLE 3-10: ERGEBNISSE AUS DER MIKROBIOLOGISCHEN KONTROLLE ALLER KOMPONENTEN IM BACT/ALERT

	VB nach Kontamination	VB nach 12h bei RT	EK	EKf	TK	TKf	GFP
A	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
C	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
E	n.n.	n.n.	n.n.	0,99h*	n.n.	n.n.	n.n.
F	n.n.	n.n.	0,72h*	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
G	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
H	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
I	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

* Nachweiszeit im Bact/ALERT. Beide EKs wurden nach Ankunft im PEI beprobt und wiesen nach drei Tagen Wachstum auf (10 ml Probe und Inkubation im Bact/ALERT).

In den mit plasmidlosen *Yersinia enterocolitica* Stamm kontaminierten Beuteln A bis C konnte kein Wachstum festgestellt werden, ebenso nicht in den Beuteln G bis I, die mit der niedrigen Keimzahl des plasmidhaltigen Stammes kontaminiert waren. Einzig in Beutel EK E2 (filtriertes EK) und EK F1 (nicht filtriertes EK) wurde *Yersinia enterocolitica* im Kulturautomaten nachgewiesen. Aus den positiv detektierten Kulturflaschen wurde *Y. enterocolitica* reisoliert und per API-Test und Mikroskopie (s. **Abbildung 3-29**, **Abbildung 3-30**) identifiziert.

Im Versuch mit Blutbeuteln wurde immer wieder beobachtet, dass sich die Farbe des Blutes veränderte. Es nimmt bei einer Anreicherung von *Yersinia enterocolitica* eine sehr dunkelrote bis schwarze Färbung an. Eine Kontrolle der Farbe sollte deshalb immer durchgeführt werden, jedoch ist ohne einen direkten Vergleich die Identifizierung problematisch (s. **Abbildung 3-32**).



Abbildung 3-32: EK-Beutel aus dem Vollblutversuch Nr. 2 in Springe.

In Abbildung A sind die EK-Beutel D bis I zu sehen, die aus dem mit PEI-A-101-02 kontaminierten Vollblut generiert wurden. Im direkten Vergleich in Abbildung B (Ansatz F) und C (Ansatz E) sind Unterschiede in der Färbung der Komponente zu sehen. Die EKs, in denen Wachstum auftrat, sind mit F1 und E2 markiert.

Die Abreicherung der Leukozyten durch die Filtration ist in **Abbildung 3-33** dargestellt. EK C2 und EK E2 wiesen nach der Filtration mit etwa 90% mehr Leukozyten auf als die verbleibenden filtrierte EKs (der Ansätze A, B, D, F, G, H und I), die im Mittel 1,21 Leukozyten/ μ l EK enthielten. Diese Komponenten

entsprachen bzgl. der Leukozyten-Abreicherung nicht den Spezifikationen von 10^6 Leukozyten pro Komponente der Richtlinien zur Hämotherapie, blieben jedoch unter dem Wert von 10^7 Leukozyten/Einheit. 10% dieser hergestellten Komponenten dürfen in den Verkehr gebracht werden.

Nach Fraktionierung des Vollblutes bzw. vor Leukozyten-Depletion waren in den nicht filtrierte Komponenten im Mittel noch 2713 Leukozyten pro μl im EK zu finden. Dies entspricht einer Abreicherung von 41,4% bei einer mittleren Leukozytenzahl im Vollblut von 6546 Leukozyten.

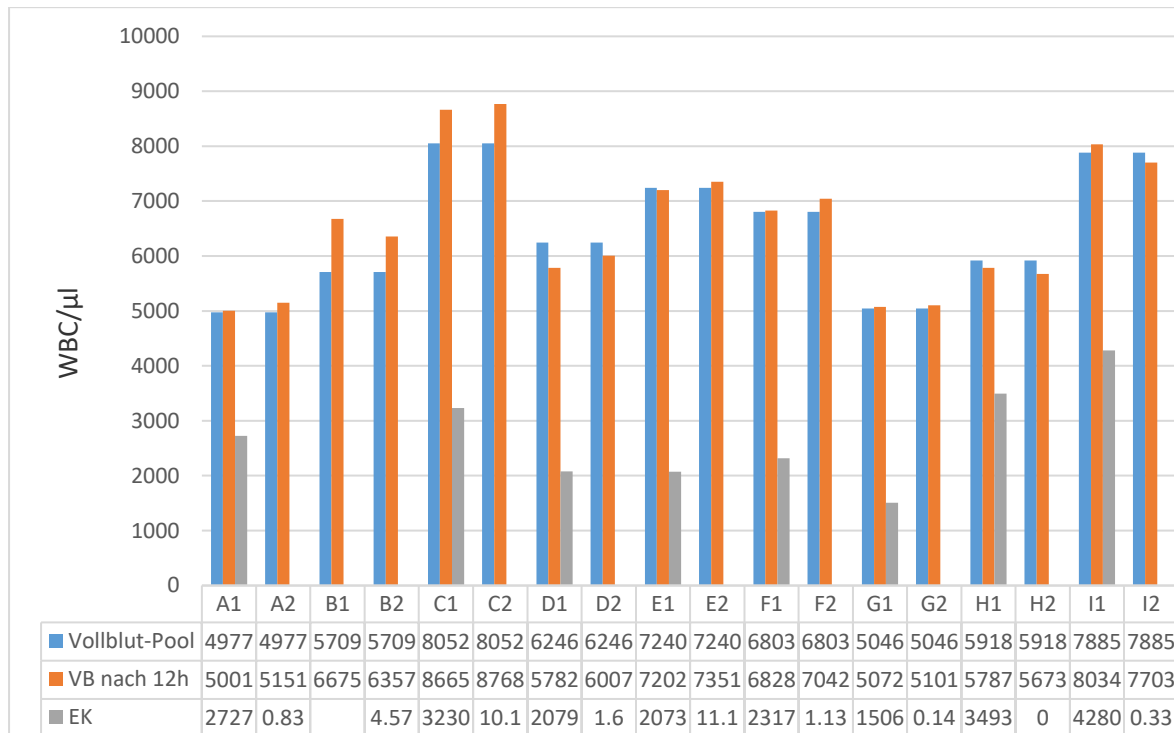


Abbildung 3-33: Leukozytenbestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Aus dem VB-Pool, nach Teilung, Kontamination und 12-stündiger Inkubation bei RT, nach Separation aus EK. Die Ziffer 1 markiert die unfiltrierte Komponente, Ziffer 2 das leukozytendepletierte EK. Komponente B1 wurde nicht gemessen, da versehentlich beide Komponenten filtrierte wurden.

4 DISKUSSION

4.1 DIE SPEZIES *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Die Pathogenität bzw. Virulenz von *Yersinia enterocolitica* wird über die Exprimierung der Virulenzfaktoren auf dem Plasmid gesteuert. Plasmidhaltige Stämme können sich so gegen die Abwehrmechanismen des Wirtes schützen. Avirulente Stämme ohne Plasmid werden vom Wirt eliminiert. Um die unterschiedlichen Eigenschaften von *Yersinia*-Stämmen zu berücksichtigen, war es notwendig plasmidhaltige und plasmidlose Bakterienzellen zu untersuchen.

Für die Versuche mit *Yersinia enterocolitica* wurden zwei Stämme ausgewählt, die ursprünglich aus Patientenproben isoliert wurden. Einer der Stämme wurde als plasmidhaltiger Stamm bezogen. Beim anderen, als Kontrolle eingesetzte Stamm, konnte kein Plasmid nachgewiesen werden, weshalb dieser von der DSMZ als „Autoagglutination negativ“ klassifiziert wird. Dies beschreibt die fehlende Immunerkennung des nicht vorhandenen Proteins *Yersinia* adhesin A (YadA, plasmidkodiert) in der äußeren Zellmembran [206–208]. In dieser Arbeit konnte der fehlende Plasmidbesitz bestätigt werden. Beide Stämme gehören zum selben Serovar O:3, das in Deutschland am häufigsten aus Patientenproben isoliert wird [5, 209].

In der Literatur gibt es keine definitiven Aussagen über eine Reetablierung eines verlorengegangenen Virulenzplasmids. Allerdings wurden sogenannte Helferplasmide isoliert, die fähig sind pYV *in vitro* zu mobilisieren [210]. Die virulenten Komponenten (*inv* und *ail*) des Bakterienchromosoms sollten auch in den plasmidlosen Bakterien noch vorliegen. Die *ail*-Region war bei beiden Stämmen vorhanden und wurde in dieser Arbeit als Kontrolle in der PCR nachgewiesen [12].

4.2 VIRULENZMARKER

Die Pathogenitätsmechanismen von *Yersinia enterocolitica* sind komplex. Sie sind sowohl chromosomal lokalisiert. Pathogene Spezies besitzen aber auch zusätzlich ein Virulenzplasmid, von welchem in der Kultur bei Temperaturen ab >32°C Proteine exprimiert werden und es den Bakterien ermöglicht, sich vor phagozytierenden Zellen und dem Komplementsystem des Wirtes zu schützen.

Zum Nachweis der Pathogenität sind biochemische und molekularbiologische Untersuchungen möglich [12]. In dieser Arbeit wurde eine PCR etabliert, mit der die beiden Virulenzfaktoren *ail* und *virF* nachgewiesen werden konnten. Der Genort *virF* ist auf dem Virulenzplasmid lokalisiert und wurde zur Kontrolle des

Plasmids eingesetzt. Da beide Stämme das *ail*-Gen auf dem Bakterienchromosom tragen, wurde Ail als Positivkontrolle zum Nachweis von *Yersinia enterocolitica* verwendet [211]. Auch wenn das Plasmid verloren gegangen sein sollte, konnte so der Nachweis für diese Spezies erbracht werden. Die PCR wurde bei der Kultivierung des pathogenen Stammes und bei der Herstellung der Standardinokula eingesetzt, um sicherzustellen, dass das Plasmid nicht verloren geht. Nach der Kontamination von Blut und seinen Komponenten wurde bei positiven Ergebnissen überprüft, dass plasmidhaltige *Yersinia enterocolitica* isoliert wurde. Da hier keine Aussage über die Anzahl der pYV-positiven Zellen getroffen werden konnte, wurde der Nachweis später in Blut anhand der Koloniegrößendifferenzierung durchgeführt (s. 2.6.2 und 3.4).

4.3 QUANTIFIZIERUNG DER PLASMIDHALTIGEN BAKTERIENZELLEN

Um die tatsächliche Anzahl an virulenten *Yersinia enterocolitica*-Zellen im plasmidhaltigen Standard zu bestimmen, wurde im ersten Schritt eine Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) etabliert. Dafür wurden die Bakterien auf Objektträgern fixiert. Die Hybridisierung mit Fluoreszenz markierten Sonden erlaubt die Detektion der *virF*-Region von plasmidhaltigen Zellen, welche mikroskopisch durch ihre Fluoreszenz sichtbar werden. Nach der Hybridisierung waren jedoch keine fluoreszierenden (plasmidhaltigen) Zellen zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass das Plasmid in einer zu geringen Kopienzahl in der Bakterienzelle vorgelegen hat und dadurch die Fluoreszenz zu gering war, um mit dem Auge detektiert zu werden. Die Vermutung, dass es sich um ein Single-Copy-Plasmid handelt, wurde von Herrn Professor Heesemann (emeritierter C4-Professor für Bakteriologie und Vorstand am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) im E-Mail Kontakt bestätigt [103]. Die Anzahl der Plasmide pro Zelle wurden nach seiner Aussage bisher nicht bestimmt bzw. es liegen dazu keine publizierten Daten vor.

Mit der kulturellen Differenzierung ließen sich verlässliche Aussagen über den Anteil plasmidhaltiger Zellen erzielen. Bei einigen Keimzahlbestimmungen des YEP+ Standards wurde das Mengenverhältnis von großen und kleinen Kolonien bestimmt, jede Kolonie einzeln von der Platten entnommen und auf Plasmidbesitz untersucht. In der Literatur gibt es eindeutige Aussagen von [56, 57, 66] zu der Beziehung von Koloniegröße und Plasmidbesitz von *Yersinia enterocolitica*.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass plasmidhaltige Kolonien langsamer wachsen und über den im Vergleich kleineren Durchmesser differenziert werden können. Durch den ‚Exakter Fisher-Test‘ wurde der Zusammenhang zwischen der Plasmidpräsenz und der Koloniegröße bestätigt. Nur bei einer von 77

untersuchten kleinen Kolonien wurde kein Plasmid gefunden. Beim Picken der kleinen Kolonien war das mit der Impföse aufgenommene und ins Wasser überführte Zellmaterial aufgrund der Menge unzureichend zu sehen. Deshalb ist es möglich, dass in diesem Fall nur wenig oder kein Zellmaterial überführt wurde. Bei diesem Versuch wurde *ail* aufgrund der dazu notwendigen doppelten Anzahl an Gelläufen nicht mitbestimmt.

Durch die kulturelle Differenzierung kann eine recht exakte Aussage über die Anzahl der virulenten Zellen von *Yersinia enterocolitica* getroffen werden, wenn die großen Kolonien nach 24 Stunden und die kleinen Kolonien nach 48 Stunden ausgezählt werden. In keinem der neun untersuchten Standards von Charge PEI-A-101-02 wurden weniger als 90% YEP⁺-Bakterienkolonien gefunden.

4.4 WECHSELWIRKUNGEN MIT DEM LEUKOZYTENFILTER

Die Abreicherung von Leukozyten im Erythrozytenkonzentrat (EK) wird als effektives Verfahren beurteilt, um Bakterien aus der Komponente zu entfernen (auch Leukozytendepletion oder Leukozytenfiltration (LF) genannt) [212]. Um die Wechselwirkungen der Bakterien mit dem Filtermaterial zu untersuchen, wurden verschiedene Matrices mit *Yersinia enterocolitica* (pYV⁺ und pYV⁻) kontaminiert und über zwei verschiedene Leukozyten-Filter-Typen (trocken und feucht) geleitet. Das Retentionsverhalten wurde in NaCl, Additivlösung und in ‚EK filtriert‘ (EKf) und ‚EK unfiltriert‘ (EK) bestimmt (s. Übersicht **Tabelle 4-1**).

TABELLE 4-1: MITTLERE RETENTION DER IM FILTRATIONSEXPERIMENT EINGESETZTEN STÄMME IN DEN UNTERSUCHTEN MATRIZES

Mittlere Retention (LD)		PEI-A-101-02	PEI-A-102
Trockenfilter Fresenius-Kabi	NaCl	96%	51%
	EKf vor LD	89%	91%
	EKf nach LD	98% (81%)*	76% (63%)*
Feuchtfiler Macopharma	PAGGS-M	99,8%	-
	EK vor LD	99% (99,7/98,3)**	-
	EK nach LD	97% (99,8/94,6)**	-

*Mittelwert aus zwei Beuteln (MW aus drei Beuteln)

**Mittelwert aus acht Beuteln (Beutel 1-4/Beutel 5-8)

Die ersten Experimente mit den Matrices NaCl und EKf (außerhalb der Lagerzeit) wurden mit beiden Stämmen und mit dem Trockenfilter von Fresenius durchgeführt. NaCl wurde eingesetzt, um die Adhäsion

der Bakterien im Filter zu überprüfen. EKf wurde als Matrix aufgrund der ähnlichen Zusammensetzung (wie EKs nach der Herstellung) gewählt, wobei sich am Ende der Lagerzeit Zelldebris (tote Blutzellen, Aggregate aus Zellmaterial) angereichert haben kann, der die Filtrationsleistung beeinflusst haben könnte. Im EKf waren aufgrund der vorherigen Filtration und der langen Lagerungszeit (> 5 Wochen) keine funktionierenden Monozyten (Lebensdauer 1-3 Tage) mehr zu erwarten. Eine Abreicherung durch Phagozytose kann somit ausgeschlossen werden.

Für das im Anschluss an den ersten Filtrationsversuch durchgeführte Vollblut-Kontaminations-Experiment im DRK BSD Springe wurden zur Herstellung der filtrierten EK Komponenten ein im Beutelsystem integrierter befeuchteter Filter eingesetzt. Auch die Beutelsysteme für die Vollblutspende von der Firma Fresenius-Kabi werden vor Filtration der EKs befeuchtet. Daraufhin wurden weitere zusätzliche Filtrations-Versuche mit den in der Routine verwendeten Feuchtfiltern, einzig mit dem virulenten Stamm PEI-A-101-02 und frischen, noch nicht leukozytendepletierten EKs durchgeführt, um so realitätsnah wie möglich zu arbeiten. Die Wechselwirkung des Filters mit pathogener *Yersinia enterocolitica* wurde mit kontaminierter Additivlösung untersucht.

Die Leukozytenfiltrations-Experimente mit Erythrozytenkonzentrat wurden, anders als mit NaCl und Additivlösung, zusätzlich auch nach vierstündiger Inkubation bei RT durchgeführt, um einerseits den Phagozyten zu ermöglichen, die Bakterienzellen zu finden. Andererseits sollten die Bakterienzellen im unfiltrierten EK die Chance bekommen sich an phagozytierende Blutzellen, insbesondere an Monozyten, anzuheften und einzudringen um sich vor dem Komplement zu schützen, berücksichtigt man die aufgestellten Hypothesen in der Literatur [154]. Im EKf waren durch die kurze Lebensdauer der Phagozyten im Blut und der Lagerzeit des EKs von mehreren Wochen keine Wechselwirkung mit den Bakterien mehr zu erwarten, wurde aber eingesetzt, da diese Matrix eine sehr ähnliche Zusammensetzung hat wie das in der Routine relevante unfiltrierte EK.

4.4.1 NACL (LF 1) UND ADDITIVLÖSUNG (LF 2)

Für die Matrix NaCl wurde die Wechselwirkung von Stamm PEI-A-101-02 und Stamm PEI-A-102 im Trockenfiltermaterial untersucht. PAGGS-M war im Feuchtfilter bereits integriert und wurde deshalb als Matrix verwendet um das Retentionsverhalten des plasmidhaltigen Stammes PEI-A-101-02 in dieser Matrix zu erfassen.

Die virulenten Bakterienzellen des Stammes PEI-A-101-02 zeigten ein gutes Adhäsionsverhalten in den Ansätzen mit NaCl (95%, 96%, 97%) und mit Additivlösung (99,8%, 99,7%, 99,8%, 99,8%). Es ist davon

auszugehen, dass die Bakterienoberfläche stärker als die der YEP-Zellen mit dem Filtermaterial in Wechselwirkung tritt (s. **Abbildung 4-1** und **Abbildung 4-2**) und die Bakterien keine Vehikel wie z.B. Monozyten benötigen, um im Filter haften zu bleiben. Auch AuBuchon konnte in der mit *Yersinia enterocolitica*, Serotyp O:3 kontaminierten Matrix NaCl Retentionsraten von 100% nach Filtration beobachten [105].

Uliczka fand vor einigen Jahren heraus, dass *inv* bei *Yersinia enterocolitica* der Serogruppe O:3 überexprimiert wird und diese Serogruppe durch die vermehrten Rezeptoren auf der Bakterienoberfläche ein erhöhtes Adhäsionsverhalten ggü. Körperzellen zeigte [38]. Nach Uliczka wurde die Expression von *Inv* in O:3 Serotypen zwischen 23°C und 26°C siebenfach verstärkt, was die erhöhte Adhäsion der plasmidhaltigen *Yersinia enterocolitica* Zellen in den Experimenten dieser Arbeit erklären würde [21]. Ob die erhöhte Expression plasmidabhängig verstärkt wird, also bei Verlust des Plasmids herabgesetzt sein kann, wurde in der Arbeit von Uliczka nicht beschrieben.

Da der Bakterienstandard PEI-A-101-02 aus plasmidhaltigen und plasmidlosen Bakterienzellen besteht, wurde der Einfluss des Filters auf die Plasmidpräsenz durch Bestimmung des Verhältnisses der beiden Populationen bestimmt. In NaCl war das Verhältnis von kleinen zu großen Kolonien nach der Filtration geringfügig verändert. Vor Depletion lag der Anteil an großen Kolonien im Mittel bei 8,28%, danach bei 12,07%. Die Kolonien auf den Agarplatten lagen in einem gut auszählbaren Bereich und es kann davon ausgegangen werden, dass die Keimzahl korrekt erfasst werden konnte. Betrachtet man die Koloniegrößen separat, ist die Retention bei beiden Populationen recht gleichmäßig (s. **Abbildung 4-1**).

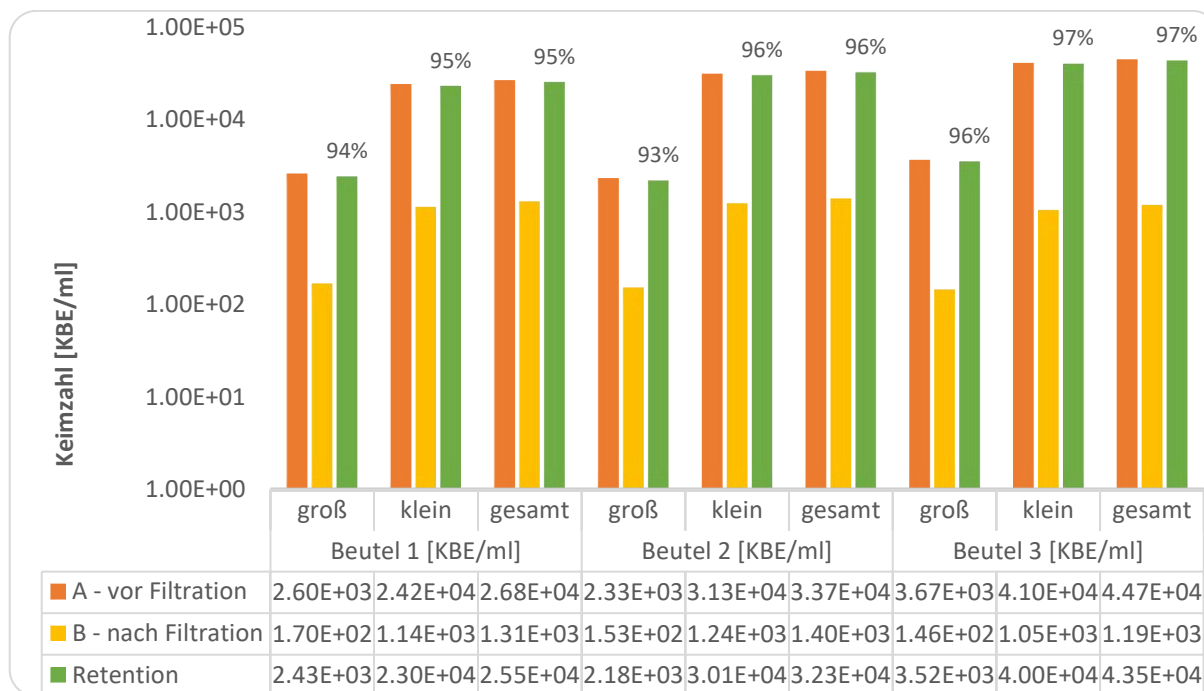


Abbildung 4-1: Retention von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 im Leukozyten-Filter in der Matrix NaCl.

Die Schwankungen in der Retention für den plasmidlosen Stamm PEI-A-102 in NaCl waren recht groß mit Werten von 86%, 26% und 40%. Hierbei ist die geringe Anfangskeimzahl zu berücksichtigen, die möglicherweise zur veränderten Zahlen geführt haben könnte. Die beiden eingesetzten Bakterienstämme (YEP+ und YEP-) zeigten in NaCl unterschiedliche Ergebnisse. Bei Zellen mit Plasmid wurde anhand der Daten eine höhere Filtrationsleistung bzw. eine bessere Adhäsion mit dem Filtermaterial festgestellt.

In der Additivlösung fand in allen vier parallel getesteten Beuteln eine sehr gute Retention des plasmidhaltigen Stammes statt. Das Verhältnis der beiden Populationen zueinander veränderte sich durch die Filtration sehr unterschiedlich. In zwei von vier Beuteln war die Rate an großen, plasmidlosen Kolonien nach Filtration etwas geringer als vor der Filtration, in den anderen beiden Beuteln verdreifachte sich der Anteil. Durch die starke Abnahme der Keimzahlen nach der Filtration ist das Verhältnis möglicherweise nicht richtig abgebildet. Große Kolonien waren in der Additivlösung nach Filtration in Keimzahlen von 3,4 bis 13,4 KBE/ml, kleine Kolonien zwischen 26,7 und 70 KBE/ml vorhanden (s. **Abbildung 4-2**). Die Keimzahlen pro 100 µl waren so gering, dass die Ergebnisse nicht mehr als valide bezeichnet werden können. Um eine genaue Aussage zu erhalten, müsste der Versuch mit höheren Keimzahlen wiederholt werden. Allerdings könnten zum wiederholten Mal der größte Teil der Bakterien am Filtermaterial

adsorbieren und ähnliche Ergebnisse generieren oder die Kapazität des Filters könnte ausgeschöpft und alle Zellen gleichermaßen durchlassen werden.

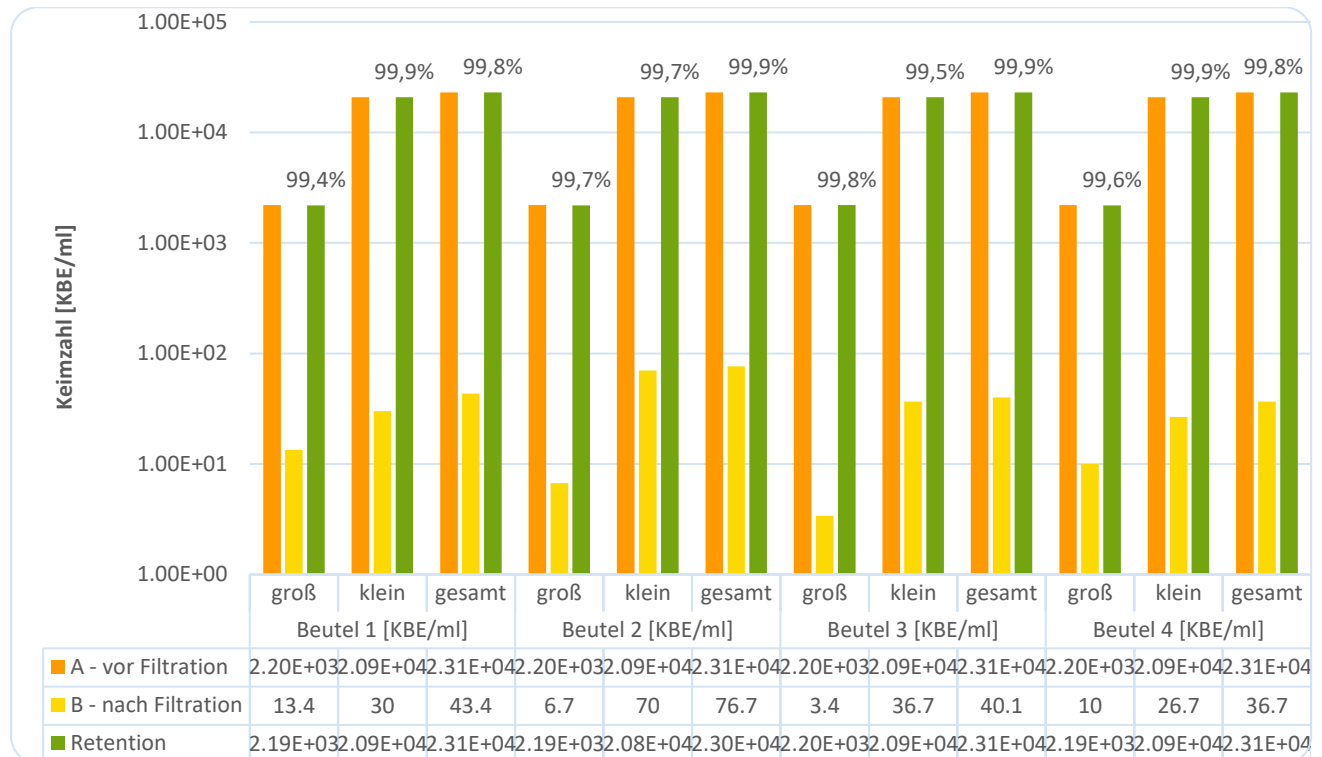


Abbildung 4-2: Retention von *Yersinia enterocolitica* Stamm PEI-A-101-02 durch Filtration in der Matrix Additivlösung.

4.4.2 MATRIX ‚EK FILTRIERT‘ (LF 3)

Für die Matrix ‚EK filtriert‘ wurde das Adhäsionsverhalten der Stämme PEI-A-101-02 und PEI-A-102 im Trockenfilter untersucht.

In dieser Matrix wurden im Mittel 10,7% der plasmidhaltigen Bakterien im Filtrat wieder gefunden (s. **Abbildung 4-3**). Verglichen mit den anderen Matrices zeigten die pYV⁺ Bakterien im EKf ein schlechteres Adhäsionsverhalten. Nach der vierstündigen Inkubation konnte in den Beutel 1 und 3 eine mit NaCl vergleichbare Retentionsrate von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 beobachtet werden (96% und 99,6%). Im Ansatz mit Beutel 2 aus Filtration Nr. 3 sind die Bakterienzellen nicht wie in den Parallelansätzen gewachsen und wahrscheinlich vertauscht worden (s. **Abbildung 4-4**). Dieses Ergebnis wurde deshalb in der Auswertung nicht berücksichtigt. In den Beuteln 1 und 3 wurden doppelt so viele Bakterien zurückgehalten wie bei der Filtration ohne Inkubation, allerdings waren auch die Keimzahlen doppelt so

hoch. Somit zeigten die Bakterienpopulationen aus Stamm PEI-A-101-02 bei zwei verschiedenen Filtern ähnliche Retentionsraten.

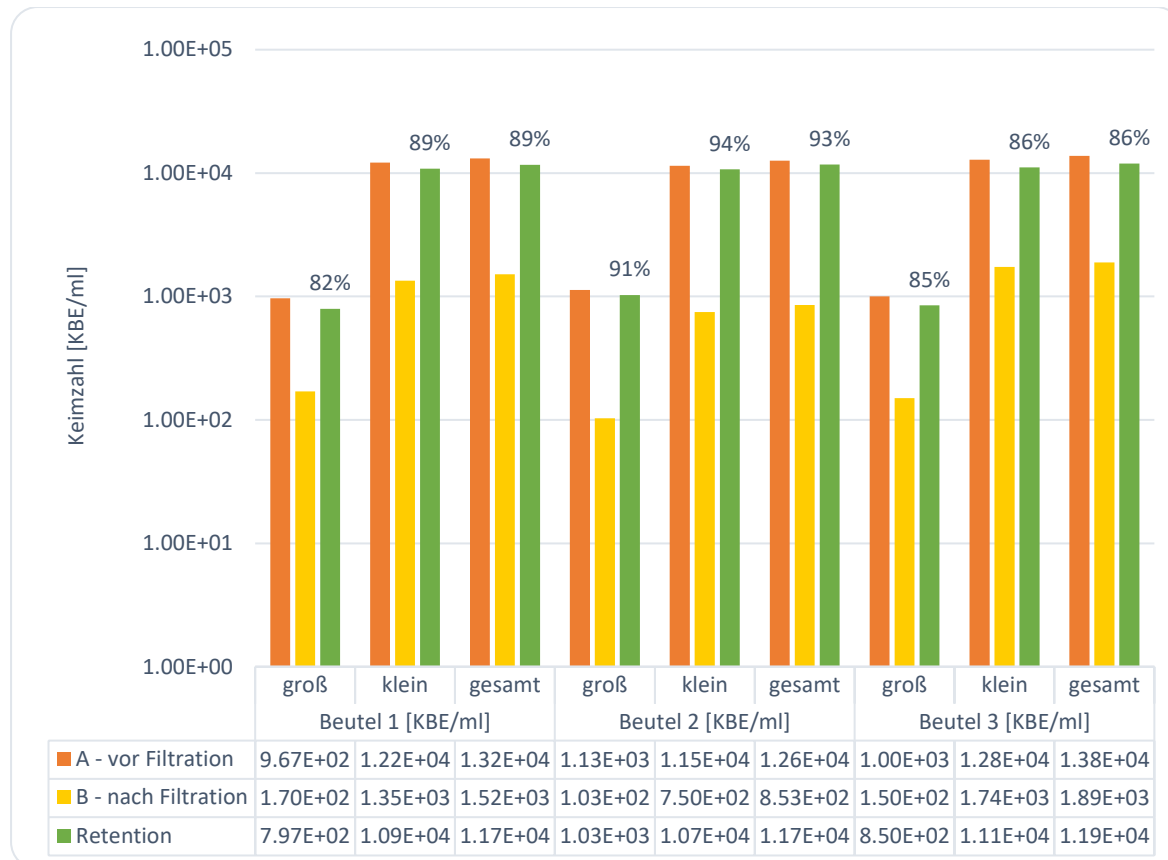


Abbildung 4-3: Retention von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 durch Filtration in der Matrix EKF nach 0 h Inkubationszeit

Der Anteil an großen, plasmidlosen Kolonien stieg nach Filtration im Mittel von 7,6% vor auf 10,3%. Nach vier Stunden Inkubation und anschließender Filtration sank die Gesamtkeimzahl um durchschnittlich 97,8% (ohne Beutel 2), und der Anteil der plasmidnegativen Bakterienzellen stieg von vorher durchschnittlich 7% auf 52,5%. In Beutel 2 war die Keimzahl nach der vierstündigen Lagerung gefallen, während sie sich in den anderen Beuteln verdoppelt hat. Der Anteil der YEP⁻-Bakterien lag vor Filtration im Beutel 2 schon bei 25% und veränderte sich danach nur noch geringfügig. Die um 18,8 % gesunkene Keimzahl kann mit der Eliminierung von plasmidlosen Bakterien durch möglicherweise noch intaktes Komplement im 4-Stunden-Zeitraum erklärt werden. Allerdings stellt sich dann die Frage, weshalb in den anderen beiden Beuteln Proliferation stattgefunden hat (es handelte sich um die Komponente eines einzigen Spenders, die auf drei

kleine Beutel aufgeteilt wurde). Insgesamt konnte ein Anstieg an plasmidlosen Yersinienzellen im Filtrat beobachtet werden. In besonderem Maße wurden also die plasmidhaltigen Zellen durch die Filtration entfernt, und dieser schon ohne Inkubationszeit ersichtliche Effekt wurde nach vier Stunden Inkubation besonders auffällig.

Die Vermutung, dass plasmidhaltige Zellen besser am Filtermaterial adhären, konnte für die Matrix EKf bestätigt werden.



Abbildung 4-4: Retention von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 durch Filtration in der Matrix EKf nach 4 h Inkubationszeit

Im filtrierten EK, das mit plasmidlosen Yersinien-Zellen kontaminiert wurde, konnte eine bessere Wechselwirkung mit dem Trockenfilter ohne Inkubationszeit mit 89%, 91% und 93% festgestellt werden als nach 4 Stunden und war somit vergleichbar mit den Filtrationsergebnissen des pathogenen Stammes (mit und ohne Inkubation). Die Keimzahlen stiegen während der Lagerung bei Raumtemperatur in den Beuteln 2 und 3 etwas an, in Beutel 1 fand eine Reduktion um fast die Hälfte der Bakterien statt. Der Filter dieses Beutels wurde nach 4h Lagerzeit am Ende der Filtration mit NaCl nachgespült, sodass die Werte nicht mit in die Bewertung einbezogen und eine Aussage über die Keimkonzentration nicht exakt getroffen werden

konnten. Die Spülung erfolgte von oben, sodass das EK weiter aus dem Filter in den Beutel B lief. Ein Verdünnungseffekt durch NaCl ist möglich und könnte die niedrige Retention von 36% im 1. Beutel erklären. Die Retention in den Beuteln 2 und 3 nach der vierstündigen Inkubation schwankte stark mit Werten zwischen 69% und 83%. Die Anzahl der inokulierten Keime war zu Beginn des Experiments bereits sehr gering, bedingt durch die Vorverdünnung in den Ausgangsbeuteln (1: 10 zur Herstellung der Bakteriensuspension für drei Parallelansätze und Verdünnung in 100 ml NaCl als Matrix). Die ausgezählten Kolonien zur Feststellung der Initialkeimzahl vor Filtration lagen teilweise unter 15 KBE pro Platte. Nach der Leukozytendepletion lag die Anzahl der Kolonien auf den Platten durch das geringe Probenvolumen im unteren auswertbaren Bereich (im Durchschnitt 5,3 KBE/ 4,7 KBE/ 4 KBE pro Platte).

Phagozytierende Zellen, an die sich *Yersinia enterocolitica* hätte anlagern können, waren im EKf weder vor noch nach Inkubation zu erwarten. Eine durch Stoffwechselprozesse im Beutel ausgelöste veränderte Affinität der Bakterienzelloberfläche durch Ladungsänderungen, pH-Abfall bzw. sterische Effekte oder durch unterschiedliche Effekte von Mikropartikeln aus dem Blut auf die plasmidlosen und plasmidhaltigen Bakterienzelloberflächen ist denkbar. Cognasse beschrieb die Bildung von Mikropartikeln, die durch Lagerung von Blutkomponenten entstehen können. Sie sind an der Aktivierung von Blutzellen bzw. an der Produktion von Entzündungsmediatoren beteiligt und könnten somit einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten auf die Bakterien und auch die verschiedenen Komponenten im EK haben [231]. Dadurch könnte das Filtermaterial mit Leukozyten bzw. entstandenen Mediatoren belegt und somit die Adhärenz für Bakterien herabgesetzt worden sein.

Das Gen für das Membranprotein Ail liegt bei beiden sero-und biogruppengleichen Standards auf dem Genom vor und kann durch den PCR-Ansatz nachgewiesen werden. Ob das Membranprotein jedoch in gleichem Maße von plasmidhaltigen und plasmidlosen Stämmen in der äußeren Zellmembran vorhanden ist, kann durch den PCR-Ansatz nicht geklärt werden. Dies wäre über einen Ail-gerichteten Antikörper möglich. Somit kann der Einfluss des Ail-Proteins auf die unterschiedliche Retention der beiden Stämme nach der Inkubationszeit mit dem Filtermaterial nicht ausgeschlossen werden.

Das membranständige Protein YadA bildet auf der Oberfläche von plasmidhaltigen Bakterien eine fibrilläre Struktur aus, die für die verbesserte Anheftung verantwortlich gemacht wird [41]. Es wird bei 37°C exprimiert. Eine verminderte Produktion wird jedoch auch bei niedrigeren Umgebungsbedingungen als Körpertemperatur angenommen [25]. Da bei der Zellteilung nur Teile der Zellen neu generiert werden, könnte sich in den ersten Generationen nach Auftauen des Standards, der bei einer Temperatur von 37°C hergestellt wurde, noch YadA auf der halben Oberfläche der plasmidhaltigen Bakterien befinden und die verstärkte Adhäsion bzw. auch eine Komplementinaktivierung hervorgerufen haben. Da die plasmidlosen

Bakterien keine Mechanismen besitzen, um der Opsonierung und Lyse durch das Komplement zu entgehen, kann an dieser Stelle vermutet werden, dass eine gewisse Restaktivität dieses Abwehrmechanismus vorhanden war, das die Mikroorganismen in unterschiedlichem Maß geschädigt haben könnte.

Li hat experimentell belegt, dass die Produktion der Yops, die die Invasion phagozytierende Zellen vermitteln, erst bei höheren Temperaturen angeschaltet (32°C) wird. Eine Aktivierung bei Raumtemperatur und eine durch Konformitätsänderung der äußeren Zellmembran resultierende Verbesserung der Adhäsion scheint deshalb nicht denkbar [25, 49, 213, 214].

Ob die verstärkte Anlagerung der plasmidhaltigen Bakterienzellen an die Filtermembranen durch YadA oder Inv induziert wurde oder andere Serovare von *Yersinia* ein verändertes Filtrationsverhalten zeigen, müsste mit weiteren Experimenten geklärt werden.

4.4.3 MATRIX ‚EK UNFILTRIERT‘ (LF 4)

Im Versuch mit der Matrix ‚EK unfiltriert‘ konnte keine Differenzierung zwischen großen und kleinen Kolonien durchgeführt werden, da das Ausplattieren mit unverdünntem oder 1:10 verdünntem EK stattfand und die Kolonien sehr unregelmäßig entlang der ausgetrockneten Blutzellen und Proteine wuchsen. Hier wurden FeuchtfILTER eingesetzt und die EKs ausschließlich mit dem plasmidhaltigen Standard kontaminiert.

Die Retention von *Yersinia enterocolitica* in den Beuteln 1 bis 4 war mit 99,7% vor und 99,8% nach der Inkubation etwas besser als in den Beuteln 5 bis 8. Beutel 1 bis 4 wurden nach der Herstellung bei 4°C gelagert. Erst kurz vor Beginn des Experimentes wurden die Beutel bei Raumtemperatur aufbewahrt. Im Unterschied dazu wurden Beutel 5 bis 8 von der Herstellung ab bei Raumtemperatur gelagert. Die mittlere Retention betrug vor Filtration 98,3% und danach 94,6%. Da die Filter (Macopharma) aufgrund von Filtermangel auch nach Inkubation verwendet wurden, kann dies die gesunkene Retentionsrate erklären. Nach Mizuno (2013) ist eine Aggregatbildung (aus Fibrin, Leukozyten und Thrombozyten) vorstellbar [172]. Eine andere Erklärung wäre eine herabgesetzte Rückhaltung der Bakterien in den Toträumen des Filters oder ein verändertes Adhäsionsverhalten, da nach vier Stunden Inkubationszeit der hydrophile Charakter des Filtermaterials durch Ladungsänderung verändert bzw. die Oberfläche des Filters durch den ersten Kontakt mit dem EK möglicherweise bereits reduziert war [133, 158, 215]. In einer Studie, in der *Yersinia enterocolitica* mit der Matrix Albumin (5%) eingesetzt wurde, konnte eine schlechte Retention beobachtet werden. Dieses Ergebnis wurde mit veränderten physikalischen Eigenschaften des Filtermaterials aufgrund

der hohen Albuminkonzentration erklärt [105]. Auch Druckänderung oder die Bildung von Luftbläschen kann die Filtrationsleistung herabsetzen [173]. Möglicherweise kann auch ein nicht einheitliches Handling im Filtrationsexperiment zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben.

Bis auf die Beutel 5 und 8 wurde eine Abnahme der Keimzahlen nach Inkubationszeit festgestellt. Ob die Temperatur einen Einfluss auf die Entwicklung von *Yersinia enterocolitica* hatte (möglicherweise zusammen mit dem individuellen Spenderblut), kann mit den bisherigen Erkenntnissen nicht erklärt werden. Hier könnte das Komplement, das noch im EK vorhanden gewesen sein sollte, einen Einfluss auf die gesunkenen Keimzahlen gehabt haben. Da die EKs alle von unterschiedlichen Spendern stammten, besteht auch die Möglichkeit, dass andere spenderspezifische Eigenschaften wie Antikörper gegen *Yersinia* oder Leukozyten zur Reduktion der Keimzahlen in 6 Beuteln geführt haben.

Insgesamt zeigt die LF mit dem FeuchtfILTER ein sehr gutes Ergebnis, sowohl mit PAGGS-M als auch mit EK. Eine Verbesserung der Retention von Bakterien durch phagozytierende Zellen des Blutes konnte in diesem Versuch nicht festgestellt werden, wodurch die Hypothesen von Högman nicht unterstützt wird [174]. Die Bakterienzelloberfläche scheint adhäsive Eigenschaften zu besitzen, die *Yersinia enterocolitica* im Filter zurück halten. Auch in der Matrix EKf, in der durch das Alter der Komponenten keine Leukozyten mehr erwartet wurden, konnte ein gutes Filtrationsergebnis mit dem Trockenfilter erreicht werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Anteil an großen Kolonien von Stamm PEI-A-101-02 weniger als 10% beträgt. Diese nachweislich plasmidnegativen Kolonien wurden im Trockenfilter mit NaCl und ‚EK filtriert‘ schlechter zurückgehalten als die Population, die die kleinen plasmidhaltigen Kolonien bildeten. Dem Plasmid ist zumindest mittelbar eine verstärkte Wechselwirkung mit dem Filter durch die pathogenen Oberflächenstrukturen zuzuschreiben. Die einzige Ausnahme bildet die Matrix PAGGS-M. Hier waren vor Filtration 10% der Bakterien plasmidlos, danach war der Anteil der großen Kolonien mit 31%, 8%, 9% und 27% in den vier Beuteln recht unterschiedlich, was aber an den niedrigen Keimzahlen im Filtrat gelegen haben kann, die das Ergebnis ungünstig beeinflusst haben könnten.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Virulenzfaktoren, die auf der Oberfläche von *Enterobacteriaceae* exprimiert werden, die Adhäsion und Invasion unterstützen [154]. Diese Eigenschaften könnten sich auch auf das Filtermaterial auswirken und die starke Rückhaltung der Bakterien mit Plasmid erklären. Um diese Hypothese zu stützen, müssten weitere Filtrations-Versuche mit apathogenen Stämmen durchgeführt werden, um festzustellen, ob sich hier das Retentionsverhalten ändert.

Weiterhin ist zu vermuten, dass auch die Matrix eine Rolle spielt, da der plasmidlose Stamm PEI-A-102 in NaCl schlechter vom Filter adsorbiert wurde als in EKf ohne Inkubation. Gong stellte fest, dass unterschiedliche Serotypen von *Yersinia enterocolitica* in unterschiedlichen Matrices (TSB, Plasma, PBS) eine variable Retention durch das Filtermaterial zeigen [143]. Aber auch bei unterschiedlichen Spezies war das Filtrationsverhalten im Vergleich sehr divergent [216].

Beide Filterarten (Trocken- und Feuchtfiler) trugen zu einer starken Abreicherung von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 bei, reichten aber nicht aus, um alle inokulierten Bakterien aus dem Blut zu eliminieren. Hierbei schnitt der Feuchtfiler von Macopharma mit maximalen Retentionsraten von 99,8% besser ab als der Trockenfilter, der in der Matrix EKf ohne Inkubationszeit nur im Mittel 89% Retention erreichte. Da die Benetzungsfähigkeit für die optimale Filtration entscheidend ist, wird vermutet, dass der vorher angefeuchtete Filter von Beginn an optimale Eigenschaften zur Retention von Zellen besitzt. Adäquate Benetzung des Filtermaterials ist substantiell, um einen optimalen Kontakt mit den Blutzellen zu erreichen [158, 217]. Heutzutage werden Inline-Filtersysteme (von beiden Herstellern) zur Herstellung von leukozytendepletierten Blutkomponenten mit der bereits integrierten Lagerlösung verwendet, die vor Beginn der Filtration zur Befeuchtung des Filter eingesetzt wird. Das hier verwendete trockene Filtermaterial von Fresenius Kabi wurde durch das EKf erst angefeuchtet und so war möglicherweise zu Beginn des Versuches die Filtrationsleistung eingeschränkt. Bis auf die Retentionsraten in den Beuteln 5 bis 8 im LD-Versuch Nr.4 (Feuchtfiler mit ‚EK unfiltriert‘), bei dem die Filter nach Inkubation nicht gewechselt wurden und möglicherweise dadurch eine etwas schlechtere Adhäsion zeigten, lag die Resorption bei nahezu 100%. Insgesamt wurden die YEP+-Bakterien vom befeuchteten Filtermaterial besser adsorbiert als vom Trockenfilter, sowohl in nicht zellhaltiger (NaCl vs. PAGGS-M), als auch in zellhaltiger Matrix (EK vs. EKf).

Aus mikrobiologischer Sicht ist eine Leukozytenfiltration von hergestellten EKs zu befürworten, da pathogene Vertreter von *Yersinia enterocolitica*, die sich im Blut des Spenders befinden, durch dieses Verfahren, zumindest zum größten Teil eliminiert werden können und so das Risiko für einen Transfusionszwischenfall sinken kann.

4.5 WACHSTUM VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA* IM BLUT

Ein Wachstum von *Yersinia enterocolitica* im Vollblut konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht nachgewiesen werden. Allerdings waren die Kontaminationskeimzahlen gering und die kontaminierten Vollblute wurden nach ca. 12 Stunden zu Blutkomponenten weiter verarbeitet. Die

Bakterien sind aber in der Lage, im Spenderblut zu überleben, da sie in zwei hergestellten EK-Komponenten wiedergefunden wurden. Die plasmidhaltigen *Yersinia*-Zellen des Stammes PEI-A-101-02 überstanden die Inkubation in Vollblut über Nacht. Der plasmidlose inokulierte Stamm konnte weder im Vollblut noch später in den hergestellten Komponenten wiedergefunden werden. Dies lässt den Schluss zu, dass es den plasmidlosen Zellen nicht möglich war, sich gegen die humorale Immunantwort zu etablieren.

In verschiedenen Publikationen wird das vorübergehende „Verschwinden“ von *Yersinia enterocolitica* im Vollblut beschrieben. Nach einer lag-Phase, deren Dauer von der Anzahl der inokulierten Bakterien und der Temperatur abhängt, konnte *Yersinia enterocolitica* aus dem Blut isoliert werden [96, 174]. Hierzu wurden Ergebnisse veröffentlicht, die zeigen, dass das Wachstum bestmöglich gehemmt wird, wenn das Blut vor Lagerung bei 4°C für einige Stunden bei einer Temperatur von 20°C inkubiert wird. Das Bakterium muss sich an die veränderte Umgebung anpassen und den bakteriziden Effekt des Plasmas überleben [85, 96].

Wie das plasmidhaltige Bakterium im Spenderblut überlebt und in die EK Komponente gelangt, bleibt allerdings unklar. Möglicherweise überleben einige Bakterien im Blut und können sich gegen Komplement und Phagozyten behaupten, lagern sich an Blutzellen an oder dringen in die Zellen ein und überleben dort. Die Produktion und der Einbau von YadA (Komplementinaktivator) könnten durch die Interaktion mit Blutzellen und Plasmaproteinen bei plasmidhaltigen Bakterienzellen bei RT getriggert werden und auf diesem Wege evtl. nicht temperaturabhängig bei 37°C verlaufen. Die Temperatur spielt für die Vermehrung aber offenbar bei der Lagerung des Vollbluts eine Rolle, da das Wachstum von *Yersinia enterocolitica* bei 20°C im Vergleich zur 4°C und 37°C bestmöglich gehemmt wird [96]. Im Gegensatz zum VB wurde Wachstum plasmidhaltiger Yersinien bei RT und auch bei 4°C in GFP, hauptsächlich in abgelaufenen EKs bei 4°C und teilweise auch in abgelaufenen TKs bei RT nachgewiesen (eigene Ergebnisse s. 3.5 und [85]).

Eine Übersicht über die Wachstumsversuche in den verschiedenen Blutkomponenten gibt **Tabelle 4-2**.

TABELLE 4-2: ÜBERSICHT ÜBER DIE WACHSTUMSVERSUCHE IN DEN BLUTKOMPONENTEN MIT BEIDEN STÄMMEN VON *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Wachstum über 14 Tage	PEI-A-101	PEI-A-102
EKf am Ende der Lagerzeit (Kapitel 3.5.1)	Wachstum, auch bei geringen Inokula von 0,03 KBE/ml EK	Wachstum bei Inokula von 3,7 KBE/ml EK bis 48 KBE/ml EK
TKf am Ende der Lagerzeit (Kapitel 3.5.3)	Nur bei Inokula ab 77 KBE/ml TK	Kein Wachstum
Gefrorenes Frischplasma (Kapitel 4.5.3)	Wachstum bei 4°C in einem von 4 gepoolten Plasmen in beiden Ansätzen der Doppelbestimmung, bei RT nur in einem Ansatz desselben Plasmas Inokulum 100 KBE/ml GFP	Kein Wachstum
EK (Kapitel 3.8.2)	Wachstum in 2 von 6 EK-Komponenten mit einem sehr geringen Inokulum von 20 KBE/ml VB	Kein Wachstum
Vollblut (Kapitel 3.7 und 3.8)	Kein Wachstumsversuch, aber starke Reduktion der Keimzahlen innerhalb von wenigen Stunden	

EKf=leukozytendepletieretes Erythrozytenkonzentrat (am Ende der Lagerzeit),
TKf=leukozytendepletieretes Thrombozytenkonzentrat (am Ende der Lagerzeit), EK=unfiltriertes Erythrozytenkonzentrat (innerhalb der Lagerzeit)

4.5.1 WACHSTUM IN PLASMA (GFP)

Im Versuch wurde aufgetautes und aus zwei Vollbluten gepooltes GFP mit dem pathogenen Stamm von *Yersinia enterocolitica* (100KBE/ml Plasma) kontaminiert. Dies entspricht der theoretischen maximalen Keimzahl, die in der Literatur für bakteriämische Spender angegeben werden [8, 83, 183]. Lebende phagozytierende Blutzellen waren in dieser Komponente durch das Einfrieren nicht mehr zu erwarten. Es wurde vermutet, dass die bei Körpertemperatur ausgeprägte Serumresistenz von *Yersinia* und auch das Komplementsystem der Spenderplasmen vollständig wirksam sind [25].

Bei 37°C jedoch konnte in einem Zeitraum von einer Woche kein Wachstum von pathogenen *Yersinia enterocolitica* Zellen nachgewiesen werden. Bei dieser Temperatur die Bakterien im Plasma nicht überleben. Zwar exprimieren die Bakterienzellen die notwendigen Proteine um sich gegen das Komplement zu schützen, wahrscheinlich sind aber die Komplementproteine dem Mikroorganismus aber mengenmäßig überlegen und könnten ihn so eliminieren. Gibb 1996 hat das Wachstum von *Yersinia enterocolitica* in verschiedenen Plasma-Verdünnungen untersucht und fand heraus, dass bei einem Anteil von 40% Plasma komplementresistente Bakterienzellen eliminiert werden konnten. Er konnte auch zeigen, dass unverdünntes Plasma bakterielles Wachstum von *Yersinia enterocolitica* vollkommen unterdrückt. Die Arbeitsgruppe verwendete plasmidhaltige und -lose *Yersinia enterocolitica* Stämme der Serogruppen O:9 und O:3, wobei die Keimzahl der Serogruppe O:3 etwas schlechter im verdünnten Plasma abgereichert wurde. Wie hoch der Anteil an eingesetzten YEP+-Bakterien (mit Serumresistenz) im Inokulum war, wurde nicht beschrieben [144].

Bei Raumtemperatur wurde in einem von zwei Röhrchen (in einem von vier gepoolten Plasmen) eine Trübung festgestellt und *Yersinia* isoliert (s. 3.5.4). In den übrigen Röhrchen konnte durch Ausstrich kein Wachstum festgestellt werden. Möglicherweise waren in diesem Röhrchen die beiden Populationen von *Yersinia enterocolitica* ungleichverteilt, so dass in einem der beiden Röhrchen auch nach 14 Tagen keine Kolonien nach Ausstrich nachgewiesen werden konnten.

In 4°C gelagertem Plasma wuchs *Yersinia enterocolitica* in zwei von acht Röhrchen. Beide Röhrchen waren mit demselben Plasma gefüllt. In den anderen drei Plasmen wurde auch nach Ausstrich keine Kolonie gefunden. Vermutlich war das Komplement in Plasma 3 nicht mehr in der Lage die Bakterien zu eliminieren. Der Einfluss durch spenderspezifische Antikörper gegen *Yersinia enterocolitica* in drei von vier Plasmen (jedes Plasma ist aus 2 Vollbluten entstanden) ist zwar möglich, dennoch recht unwahrscheinlich. Die Anzahl der potentiellen Spender unter den Infizierten (20-69-Jährige) lag im letzten Jahr bei 1,86 Erkrankten pro 100.000 Einwohner [218]. Bei einer Bevölkerung von 82 Mio. Menschen wären das 1525 potentielle Spender. Da sich diese Zahl theoretisch um 1525 Infizierte pro Jahr vergrößert, hätten bei maximal 50 Spendejahren 76560 Einwohner einen Antikörpertiter (0,1%).

Wie im Fraktionierungsversuch bei Spender 3 beobachtet wurde, könnte durch einen leichten, möglicherweise unbemerkten Infekt das Komplementsystem und die Leukozyten bereits aktiviert gewesen sein und das Wachstum im Plasma-Ansatz 3 erklärt werden. Der eingesetzte *Yersinia enterocolitica* Standard PEI-A-101-02 bestand zu über 90% aus plasmidhaltigen Bakterienzellen. Auf den positiven Kontrollplatten waren beide Zelltypen zu sehen. Somit werden beide Röhrchen des Plasmas 3 einerseits

bei den niedrigeren Temperaturen von 4°C die immunologische Funktionalität verloren oder vermindert haben (verlangsamte Molekülbewegung [219]).

In den Plasmen, die aus kontaminiertem Vollblut hergestellt wurden, war kein Wachstum von *Yersinia* nachweisbar. Nur in einem Plasma aus dem Fraktionierungsversuch wurden nach Auftrennung noch einige Bakterien gefunden. Plasma scheint *Yersinia enterocolitica* eliminieren zu können und die Ergebnisse sprechen dafür, dass das Bakterium trotz seiner Virulenzfaktoren nicht in der Lage ist, sich im Vollblut durch den hohen Plasmaanteil zu etablieren.

4.5.2 WACHSTUM IN ERYTHROZYTENKONZENTRAT

Das Wachstum von *Yersinia enterocolitica* wurde in zwei Versuchsansätzen untersucht. In EK-Versuch Nr. 1 wurden der plasmidhaltige Stamm PEI-A-101-01 und der plasmidlose Stamm PEI-A-102 getestet. In EK-Versuch Nr. 2 wurde der plasmidhaltige Stamm PEI-A-101-02 verwendet, da dieser später durchgeführt wurde und die erste Charge des plasmidhaltigen Standards aufgebraucht war. Das Verhältnis von plasmidhaltigen zu plasmidlosen Bakterienzellen wurde in Charge 01 nicht bestimmt.

In allen filtrierten, allerdings schon außerhalb der Lagerzeit befindlichen Komponenten konnte bei 4°C eine Vermehrung der Keimzahl vom virulenten und auch vom nicht plasmidhaltigen Stamm nachgewiesen werden. Der avirulente Stamm erreichte eine maximale Keimzahl von fast 10^6 KBE/ml nach 30 Tagen bei einem Startinokulum von 38 bis 48 KBE/ml EK. Die plasmidhaltige Variante erreichte im selben Zeitraum eine Keimzahl von 10^7 KBE/ml, startete jedoch etwas höher bei 77 und 124 KBE/ml EK. Damit lagen in beiden Fällen die maximalen Keimzahlen unterhalb der maximalen Keimzahl von $5,1 \times 10^7$ KBE/ml im EK-Versuch Nr. 2. Die inokulierten Keimzahlen lagen hier im Mittel bei ca. 0,4 KBE/ml. Bei einem Plasmavolumenanteil von 25 ml (1/12 des Gesamtvolumens der EK-Komponente) und dem Alter der Komponente wurde das Wachstum durch fehlende phagozytierende Leukozyten und geringe Komplementaktivität nicht behindert. Gibb publizierte Ergebnisse, die zeigen, dass der Plasmaanteil im EK so gering war, dass dieser keinen bakteriziden Effekt aufwies [144].

Die unterschiedlich hohen Endkeimzahlen nach Kontamination mit dem plasmidhaltigen Stamm in EK-Versuch Nr. 1 nach 30 Tagen und Nr. 2 nach 21 Tagen könnten durch unterschiedliche Verhältnisse von plasmidhaltigen zu plasmidlosen Zellen im Inokulum zustande gekommen sein. Einerseits wurden unterschiedliche Chargen von Stamm PEI-A-101 eingesetzt, wobei in EK-Versuch Nr. 1 das Verhältnis von YEP+ zu YEP- nicht bestimmt worden war. Die Anzahl der avirulenten Zellen könnte in Charge 01 höher gewesen sein. Da die avirulenten Zellen langsamer proliferieren und nicht die Endkeimzahlen der

plasmidhaltigen Variante erreichten, kann ein veränderter Anteil an plasmidlosen Bakterien als Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse angenommen werden.

Das verwendete Volumen von 50 ml EK im EK-Versuch Nr. 1 wirkte offenbar limitierend auf die erreichbare Endkeimzahl. Trotz längerer Inkubation erreichte die Keimzahl im YEP+ Stamm (Charge 01) nur knapp 10^7 KBE/ml, während im Versuch Nr. 2 und der verwendeten Charge 02 (des plasmidhaltigen Stammes) in den EK-Beuteln mit 300 ml Keimzahlen zwischen 5×10^7 KBE/ml und 6×10^8 KBE/ml nachgewiesen werden konnten. Neben dem kleineren Blutvolumen könnten auch das Alter der Blutkomponenten und das Material der Beutel die Proliferation der Bakterien beeinflusst haben. Die Aliquots in EK-Versuch Nr. 1 wurden in speziell angefertigten Baxter-Beuteln (für Versuchszwecke, Material unbekannt) gelagert, wohingegen die Komponenten aus EK-Versuch Nr. 2 in den Originalbeuteln blieben, die auf die Bedürfnisse der Erythrozyten abgestimmt sind. Möglich ist eine stärkere Senkung des pH-Wertes infolge des kleineren Beutelvolumens bzw. schnellere Anreicherung von Stoffwechselprodukten im Beutel, wie z.B. Kohlendioxid aufgrund der kleineren Oberfläche.

Im Versuch VB Nr. 2 im frischen unfiltrierten EK jedoch war ein Einfluss des Blutes auf das bakterielle Wachstum zu beobachten. Der Plasmaanteil war mit <25 ml im EK (ca. 300 ml) recht gering [122]. Dennoch konnte im frischen, noch nicht filtrierten EK vier Stunden nach Kontamination in sechs von acht Beuteln eine Reduktion der *Yersinia* Zellen um die Hälfte beobachtet werden. In den übrigen beiden EKs wurde ein leichtes Wachstum festgestellt. Die Bakterien ließen sich durch den hohen Anteil von ausgestrichenen Blutzellen auf dem Nährboden nicht eindeutig anhand der Koloniegröße differenzieren, weshalb keine Aussage über deren Plasmidgehalt getroffen werden konnte. Dass phagozytierende Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die Abnahme der Keimzahlen hatten, ist aber nicht anzunehmen, da im untersuchten Plasma (s. 3.5.4), in dem durch den Einfrier- und Auftauprozess keine lebenden Leukozyten mehr zu erwarten waren größtenteils keine Bakterien wiedergefunden wurden und im TK (s. 4.5.4) eine stärkere Abreicherung der Bakterien stattfand als in den EKs vor LF.

Auch in den frischen EKs aus dem Fraktionierungsversuch (Labormaßstab, s. 3.7.1) konnten die Bakterien direkt nach Herstellung nicht vollständig abgetötet werden. In diesem Versuch wurde frisches Vollblut im Vierfachansatz (je 8 ml) kontaminiert, zentrifugiert und die entstandenen Phasen/Komponenten auf Wachstum untersucht. Parallel wurde eine Positivkontrolle mitgeführt, um die Entwicklung der Keimzahlen während des Versuchs zu vergleichen. Im Buffy-Coat, in dem sich die Leukozyten nach der Zentrifugation am stärksten angereichert haben müssten, war ebenfalls keine vollständige Eliminierung der Bakterien zu erkennen. Allerdings war die Keimzahl dort im Vergleich zum Vollblut direkt nach Inokulation um mehrere log-Stufen (von $2,3 \times 10^5$ KBE/ml auf $2,57 \times 10^2$ KBE/ml und $2,97 \times 10^2$ KBE/ml) reduziert. Diese Abnahme

kann einerseits durch die Verteilung der Bakterien bei der Zentrifugation, aber auch durch Phagozytose und/oder Komplementaktivierung stattgefunden haben. Ersteres ist unwahrscheinlich, da die Gesamtkeimzahl der in den Komponenten erfassten Bakterien von Spender 1 und 2 um ein vielfaches geringer war als bei Inokulation (s. **Abbildung 3-27**). Die Fraktionierung fand im Labormaßstab unter nicht standardisierten Bedingungen statt. Diese Ergebnisse können deshalb nur orientierend mit in die Auswertung einbezogen werden.

Im durchgeführten VB-Versuch Nr. 2 (s. 3.8.2) wurde im Ansatz 2 (mit hoher Keimzahl an plasmidpositiven Bakterien, **Tabelle 3-9**) eines der drei hergestellten, vorher kontaminierten, nicht filtrierten EKs (F1) positiv. Auch dieses Ergebnis spricht gegen eine funktionierende Phagozytose der Leukozyten im Medium EK.

Nach der Auftrennung des Vollblutes (VB-Versuch Nr. 2, Ansatz 2) wurde innerhalb von drei Tagen nicht nur in Beutel F1 im Kulturautomaten Wachstum detektiert, sondern auch in E2, das filtriert gelagert wurde. Zwei von sechs hergestellten EK-Komponenten wurden somit positiv. Nach Auftrennung muss deshalb mindestens je eine intakte *Yersinia enterocolitica*-Zelle in die positiven EK-Komponenten verteilt worden sein. Im Versuch VF Nr. 1 wurden im EK 0,026% der inokulierten Bakterien in der EK-Fraktion wiedergefunden. Übertragen auf den VB-Versuch Nr. 2 hätten hier nach Herstellung der EKs bei einer Anfangskeimzahl von $1,1 \times 10^4$ KBE/Beutel noch ca. 3 KBE die unfiltrierte Komponente erreicht. Erwartungsgemäß wäre dann in den drei unfiltrierten Komponenten Wachstum aufgetreten. Zwei von drei unfiltrierten EK-Komponenten blieben aber negativ. Stattdessen wurde ein leukodepletiertes (EK E2) von drei positiv. Bei einer Retention von 96,8% (schlechtester Retentionswert mit dem Feuchtfiler) sind theoretisch alle plasmidhaltigen *Yersinia enterocolitica* Zellen vom Filter entfernt worden (maximal 0,1 KBE hätte in das filtrierte EK gelangen können). Im unfiltrierten Partner-EK war jedoch kein Wachstum nachweisbar. Eine Verwechslung der Beutel ist unwahrscheinlich, da die Beutel alle vor Beprobung den Kulturflaschen ordnungsgemäß zugeordnet worden sind und mehrmals überprüft wurden. Auch wurden an unterschiedlichen Tagen mehrere Proben aus diesem Beutel gezogen, die alle dasselbe Ergebnis zeigten. Da die Ergebnisse der beiden EKs F1 und E2 nach wenigen Tagen und kurzer Detektionszeit im Automaten vorlagen, liegt die Vermutung nahe, dass die inokulierten Keimzahlen in den Beuteln bei Beimpfen der Kulturflaschen bereits recht hoch waren. In einem hier nicht dokumentierten Versuch wurden definierte Keimzahlen von *Yersinia enterocolitica* in EK im BacT/ALERT inokuliert. Eine Nachweiszeit von <1 Stunde wurde hier mit einer Keimzahl über 10^7 KBE/ml korreliert. Das dritte Paar des plasmidhaltigen Ansatzes mit hoher Keimzahl (Ansatz D, **Tabelle 3-9**) zeigte bis zum Ende der Untersuchungen kein Wachstum.

Vor und nach Filtration der EKs wurde in den Beuteln die Anzahl der Leukozyten bestimmt. Zwei von neun filtrierten EK-Komponenten (C2 und E2) wiesen auch nach Leukozytendepletion noch recht hohe Werte

auf, die die in den Richtlinien zur Hämotherapie festgelegte Grenze von 10^7 Leukozyten/Einheit nicht überschritten [122]. Allerdings sollen 90% der geprüften Präparate die Spezifikationen von 10^6 Leukozyten/Einheit erfüllen. Im Experiment lag der Prozentsatz mit 22% somit über dem Sollwert. Die Ursache kann durch das Poolen des Vollblutes die Bildung von Aggregaten im unbehandelten EK sein, welche die Filterwirkung herabsetzen und dadurch die höheren Leukozytenzahlen im Filtrat verursacht haben könnte [122]. Da in EK E2 erhöhte Leukozytenzahlen und bakterielles Wachstum gefunden wurden, kann vermutet werden, dass die Wirkung des Filters herabgesetzt war. In der anderen Komponente EK C2 mit erhöhtem Wert nach der LF war der plasmidlose Stamm verwendet worden, der sich im Vollblut nicht durchsetzen konnte und auch in den unfiltrierten EKs nicht gefunden wurde.

4.5.3 WACHSTUM IN ADDITIVLÖSUNG

Um den Einfluss der Additivlösung auf die Vermehrung von *Yersinia enterocolitica* PEI-A-101-02 zu untersuchen, wurde das Filtrat aus Beutel 2 des Versuchs LF 2 über einen Zeitraum von einer Woche auf bakterielles Wachstum getestet. Zu Beginn des Versuchs wurde eine Keimzahl von 76 KBE/ml im Filtrat von Beutel 2 festgestellt (dies war der Versuchsansatz (n=4) mit der größten Anzahl an Bakterien im Filtrat). Eine leichte Abreicherung auf 17 KBE/ml konnte über den Zeitraum von 7 Tagen festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass PAGGS-M weder einen wachstumsfördernden noch hemmenden Effekt bei 4°C im EK hat und dass das Wachstumsverhalten von *Yersinia enterocolitica* in EKs unabhängig von der Additivlösung ist.

4.5.4 WACHSTUM IN THROMBOZYTENKONZENTRAT

Der Wachstumsversuch fand in zwei unterschiedlichen TKs statt. Jedes TK wurde in vier gleiche Teile zu je 50 ml aliquotiert und in Baxterbeutel abgefüllt. Die Entwicklung von *Yersinia enterocolitica* wurde mit verschiedenen Initialkeimzahlen (<10 KBE/ml, 10-100 KBE/ml) und den Stämmen PEI-A-101-01 und PEI-A-102 überprüft. Im zweiten Durchgang wurde der verbliebene Rest von 65 ml mit $>10^4$ KBE/ml beimpft (s. 4.5.2). Aufgrund der im TK vorhandenen Proteine des Komplementsystems ist bakterielles Wachstum von der inokulierten Bakteriendichte, der Temperatur und der vorhandenen Pathogenitätsfaktoren abhängig, die es dem Bakterium ermöglichen im Blut zu überleben [85, 143, 216]. Der erhöhte Plasmaanteil im TK im Vergleich zum EK kann zur Eliminierung der in geringer Zahl inokulierten Bakterien beigetragen haben [96, 143]. Der pathogene Stamm von *Yersinia enterocolitica* wuchs nur in den bereits abgelaufenen TKs nach einer mindestens 8-tägigen lag-Phase und einer Mindestkeimzahl von 77 KBE/ml.

In der Literatur werden Abwehrmechanismen der Thrombozyten beschrieben, die das Wachstum der Bakterien beeinträchtigt haben könnten [220]. Diese Blutzellen besitzen durch die Freisetzung eines Defensins antimikrobielle Eigenschaften [220]. Zu Beginn der Versuche waren die Thrombozyten vermutlich noch intakt, da die Lebensdauer der Blutplättchen 7-10 Tage beträgt [135, 139].

Das nicht filtrierte TK im VB-Versuch Nr. 1, bei dem eine Keimzahl von $2,62 \times 10^7$ KBE/Beutel (ca. $5,24 \times 10^5$ KBE/ml VB) eingesetzt wurde, zeigte direkt nach der Auftrennung im BacT/ALERT (Probenvolumen 10 ml) Wachstum. Im VB-Versuch Nr. 2 mit niedrigerem Inokulum (10^1 KBE/Beutel und 10^4 KBE/Beutel) konnte sowohl in den unfiltrierten als auch in den leukozytendepletierten TKs der kontaminierten und anschließend fraktionierten Vollblute zu keinem Zeitpunkt der TK-Lagerperiode (bis 5 Tage nach Herstellung) im BacT/ALERT *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass viele *Yersinia enterocolitica* Zellen trotz ihrer Abwehrmechanismen im plasmareichen Blut abgetötet wurden und nur wenige überlebten. Diese konnten sich gegen die Immunabwehr behaupten oder möglicherweise durch Zusammenlagerung von mehreren Bakterienzellen (mögliche Aggregatbildung) vor der Eliminierung bzw. dem direkten Kontakt mit den Phagozyten/Komplement entziehen.

4.5.5 WACHSTUM IN FRISCHEM VOLLBLUT

Es gibt einige Publikationen über das Wachstum von verschiedenen pathogenen *Yersinia enterocolitica*-Serovaren in Vollblut. Die Autoren beschreiben übereinstimmend, dass nach der Inokulation von *Yersinia enterocolitica* in frischem Vollblut erst nach einer lag-Phase von mehreren Tagen Wachstum im Blut oder in der EK-Komponente festgestellt werden [25, 85, 143, 216]. In diesem Versuch wurden ähnliche Beobachtungen gemacht wie im TK-Wachstums-Versuch. Bei sehr niedrigen Inokulationszahlen scheint es zur Eliminierung der Bakterien (Serovar O:3) zu kommen. Selbst bei höheren Keimzahlen konnte direkt (im VB-Versuch nach 12 Stunden) nach der Kontamination in den VB-Versuchen kein Wachstum mehr nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu einem frisch kontaminierten Vollblut verändert sich die Keimzahl im Vollblut eines bereits bakteriämischen Spenders vermutlich nicht mehr stark. Möglicherweise stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der aktivierten unspezifischen Immunabwehr und der Abwehrmechanismen von *Yersinia enterocolitica* ein und ist bei der Blutspende bereits vorhanden. Die Phase nach der artifiziellen Kontamination des Vollblutes im Versuch, in der *Yersinia enterocolitica* im Versuch nicht wieder gefunden werden kann, ist dann im infizierten Spender wahrscheinlich schon vorüber oder hat nicht stattgefunden. Würde das Vollblut eines bakteriämischen Spenders auf bakterielles Wachstum kontrolliert, müsste der

Spender mit der in der Transfusionsmedizin routinemäßig eingesetzten Blutkulturautomaten identifiziert werden können, da im Spenderblut Keimzahlen zwischen 1 und 100 KBE/ml vorhanden sein sollten [8, 83, 94].

Um diese Keimdichte im Versuch nachzuahmen, müsste ein Inokulum gewählt werden, das bei Kontamination nicht sofort vollständig eliminiert wird, aber auch nicht so hoch ist, dass es die Keimzahl eines infizierten Spenders übersteigt.

Im ersten, orientierend durchgeführten Versuch wurde ein Vollblut mit einer Keimzahl von $5,24 \times 10^5$ KBE/ml mit PEI-A-101-02 infiziert, um eine Wiederfindung der Bakterien in den Komponenten zu ermöglichen. Anschließend fand die Fraktionierung statt. Hier wurde ein Ergebnis erzielt, wie es aufgrund von Literaturdaten erwartet wurde: Die unfiltrierten Komponenten wiesen Wachstum von *Yersinia enterocolitica* auf, das leukozytendepletierte TK und EK waren, wie auch das Plasma, ohne detektierbare Bakterien. Die Abschlussuntersuchung der bisher unauffälligen Komponenten wurde im BacT/ALERT durchgeführt und zeigten kein Wachstum.

Im zweiten Ansatz wurden sowohl die Wiederfindung des virulenten und des apathogenen Stammes als auch unterschiedliche Keimzahlen der plasmidhaltigen *Yersinia enterocolitica* im Vollblut und den fraktionierten sowohl unfiltrierten als auch leukozytendepletierten Blutkomponenten untersucht. Die plasmidlosen Bakterien konnten nach einer Initialkeimzahl von 10^4 KBE/Beutel zu keiner Zeit im Plasma, TK oder im EK wiedergefunden werden. Die plasmidlosen Vertreter der Serogruppe O:3 wurden vom Immunsystem der Spender in allen drei Parallelversuchen eliminiert. Bei PEI-A-102 war dies durch die fehlenden Virulenzfaktoren zu erwarten. Der plasmidlose Stamm scheint nur mit den chromosomal kodierten Mechanismen zur Verteidigung ohne die Plasmid kodierten Proteine keine Chance gegen die Bakterizidie des Blutes zu besitzen.

Die plasmidhaltige *Yersinia enterocolitica* wurde bei der niedrigen Kontaminationskeimzahl von 0,02 KBE/ml VB weder im Vollblut noch in den Komponenten wieder gefunden. Da der Standard des Stammes PEI-A-101-02 mehr als 90% virulente Zellen enthielt, war davon auszugehen, dass zumindest neun plasmidhaltige Zellen in die Beutel gelangt sind. Bei einer so geringen Inokulationskeimzahl muss allerdings mit größeren Abweichungen gerechnet werden, und so ist es möglich, dass beim Beimpfen keine Bakterien bzw. keine plasmidhaltigen Bakterien in die Beutel inokuliert wurden. Allerdings hätten bei sechs parallel inokulierten Vollbluten diese Schwankungen ausgeglichen werden müssen. Bei 11 inokulierten Bakterien und einem aus dem Fraktionierungsexperiment (s. 3.7) für EK errechneten Verteilungsprozentsatz von 0,026% ist davon auszugehen, dass keine Bakterienzelle mehr den EK-Beutel erreichte.

Im frisch gespendeten Vollblut und einer Inokulationskeimzahl von ca. 20 KBE/ml VB des virulenten Stammes konnte direkt nach Kontamination und auch nach über-Nacht Lagerung keine Kolonie in der Keimzahlbestimmung (getestet wurden je KZB 1,5 ml VB) gefunden werden. Bei einem Prozentsatz an plasmidhaltigen Bakterien von 90% im Standard war mit 18 YEP⁺-Zellen/ml zu rechnen.

Eine Abreicherung der Yersinien im Vollblut ist aus den Ergebnissen des Fraktionierungsversuches mit wesentlich höherer Inokulationskeimzahl (geringerer Probenahmefehler) ablesbar. Ausgehend von einer Initialkeimzahl von $2,33 \times 10^5$ KBE/ml waren im Mittel noch 277 KBE/ml Vollblut direkt nach Kontamination vorhanden. Ausgehend von der initialen Kontaminationskeimzahl entspricht dies einer Reduktion um 99,88% innerhalb von ca. 30 Minuten für das VB, die sich nach 4 Stunden noch leicht auf 99,99% erhöhte. Die Gesamtkeimzahl aus den aufgetrennten Komponenten betrug durchschnittlich noch 200 KBE/ml. Hier wurden noch 0,09% der Bakterien wieder gefunden. Bei Anwendung dieser Reduktionsrate auf 18 inokulierte virulente Bakterienzellen würden theoretisch 0,02 Bakterien in der Spende überlebt haben und in die EK-Komponente gelangt sein. Dass tatsächlich einzelne Bakterien überleben, zeigt VB-Versuch Nr. 2, denn in zwei (E2, F1) von sechs EK-Komponenten wurde nach Inokulation mit 20 KBE/ml VB und anschließender Auftrennung *Yersinia enterocolitica* gefunden. Eine Zusammenlagerung von mehreren Bakterien könnte die Detektion im EK trotz fehlender vorheriger Wiederfindung der inokulierten Bakterien im kontaminierten Vollblut erklären. Weiterhin war das Probenvolumen von 1,5 ml bei einem Blutvolumen von 500 ml und einem Inokulum von 18 KBE/ml sehr klein. Durch inhomogene Verteilung der Bakterien im Beutel wäre deshalb eine Entnahme von Proben ohne Bakterien möglich gewesen. Es ist auch möglich, dass sich die Bakterienzellen durch ihre Adhäsionseigenschaften an die Beutellinnenseite angelagert haben und somit der Beprobung entgangen sind. In der Literatur ist eine Anlagerung an das Beutelmateriale nicht beschrieben.

Neben den Ansätzen mit einer niedrigen Kontaminationskeimzahl (G bis I) von 11 KBE/Beutel VB gelang auch in den Ansätzen D bis F mit der höchsten Inokulationszahl von $1,1 \times 10^4$ KBE/Beutel in 4 von 6 EKs kein Bakteriennachweis. Deshalb wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass zwischen 10 und 10^4 YEP⁺-Zellen pro Beutel VB (entspricht 0,02 bis 20 KBE/ml) vorliegen müssen, damit im daraus hergestellten EK bakterielles Wachstum stattfinden kann.

Aufgrund der durchgeführten Experimente von *Yersinia enterocolitica* in Blut ist zu vermuten, dass das Komplementsystem eine große Rolle bei der Abreicherung der inokulierten Bakterien spielt. Im frischen leukozytenhaltigen Vollblut/EK ist eine zusätzliche Reduktion der Bakterien durch Phagozytose der weißen Blutzellen wahrscheinlich. Trotz der vorhandenen Abwehrmechanismen können die Bakterien in VB und seinen Komponenten überleben. Allerdings sind zumindest für VB höhere Keimzahlen notwendig

($2,33 \times 10^5$ KBE in VF Nr. 1, s. Kapitel 3.7.1). Eine intrazelluläre Existenz in humanen Zellen wird bisher nur vermutet, wurde für murine Makrophagen *in vitro* allerdings gezeigt [149, 154]. Auch aufgrund der plasmidkodierte Virulenzfaktoren, die zum Untergang der Wirtszelle führen, ist eine intrazelluläre Präsenz recht unwahrscheinlich. Deshalb stellt sich die Frage, wie *Yersinia enterocolitica* sich extrazellulär behaupten kann. Eine Rolle könnte hierbei die Adhäsion an die Oberflächen von Beuteln oder Röhrchen spielen, ebenso eine Anlagerung an Blutzellen oder Aggregieren der Bakterien, um sich vor Phagozytose zu schützen. Vorhandene Fresszellen könnten die Bakterien vorübergehend internalisiert, aber nicht abgetötet haben, was in weiteren Versuchen aber untersucht werden müsste. Es ist davon auszugehen, dass intrazellulär überlebende *Yersinia enterocolitica* Zellen durch den Untergang der Blutzellen auf Nährboden nachzuweisen sind. Die Ergebnisse des untersuchten Vollblutes aus VB-Versuch Nr. 1 waren negativ, die des VB-Versuchs nach 12 Stunden ebenfalls.

Die Pathogenitäts-Mechanismen von *Yersinia enterocolitica* sind gut untersucht. YadA und Ail auf der Membranaußenseite vermitteln Serumresistenz, die Yops triggern die Apoptose der phagozytierenden weißen Blutzellen und verhindern eine erste Immunantwort [28]. Die Mechanismen dieser Bakterienspezies zur Abwehr der Immunantwort des Wirts sprechen für eine extrazelluläre Lebensweise und Vermehrung im Blut. Für die Etablierung im Vollblut ist höchstwahrscheinlich die Fähigkeit der Bakterien zur Serumresistenz, aber auch die Anzahl der inokulierten Bakterienzellen von Bedeutung. In den hier gezeigten Ergebnissen wurde in den stark plasmahaltigen Komponenten eine deutliche Abreicherung der Bakterien beobachtet, was für eine Überlegenheit des Komplements spricht. Wie sich hohe Keimzahlen in Plasma entwickeln, müsste in einem weiteren Versuch geklärt werden.

Der Einbau von YadA in die äußere Membran findet bei Raumtemperatur nicht statt [25]. Während der Lagerung und Proliferation bei Raumtemperatur müsste die Produktion der plasmidkodierte Virulenzfaktoren unterbunden oder zumindest herabgesetzt gewesen sein. Da die Bakterienstandards bei 37°C hergestellt wurden, ist zu vermuten, dass YadA und die Yops in die Zellwand integriert waren und sich die Zellen vermutlich direkt nach Inokulation in die bei anderen Temperaturen inkubierten Matrices noch vor der unspezifischen Antwort des Wirtes schützen konnten.

4.6 VERTEILUNG DER BAKTERIEN IN DEN KOMPONENTEN NACH FRAKTIONIERUNG

Im Versuch mit kontaminierten VB-Spenden (DRK BSD Springe) konnte direkt nach Kontamination des Vollblutes kein Nachweis von *Yersinia enterocolitica* erbracht werden. Erst nach dreitägiger Beprobung der Komponenten wurde in zwei EKs Wachstum festgestellt. In diesem Experiment sollte geklärt werden, ob

sich die Bakterien möglicherweise nach der Auftrennung in der EK-Phase anreichern, da diese Spezies prinzipiell nur in dieser Komponente Transfusionszwischenfälle verursacht. EK-Komponenten stellen für *Yersinia enterocolitica* ein gutes Wachstumsmedium dar [8] und überleben möglicherweise deshalb nur in dieser Fraktion. Aufgrund der Größe der Bakterien (1-3 µm lang/0,5-0,8 µm breit) wurde vermutet, dass sie sich nach der Zentrifugation des Vollblutes in der Buffy-Coat Schicht anreichern, in der sich auch der Hauptteil der Thrombozyten (Größe 1-3 µm) befindet [133]. Die verschiedenen Blutzellen werden nach der Auftrennung einer Vollblutspende trotz ihrer unterschiedlichen Größe und des spezifischen Gewichts in vergleichsweise geringen Mengen in allen Komponenten wiedergefunden [122]. Da postuliert wird, dass pathogene Vertreter von *Yersinia enterocolitica* mit Monozyten in Kontakt treten bzw. phagozytiert werden [8] bzw. vermutet werden kann, dass die Verteilung der Bakterien ähnlich wie der Blutzellen verläuft, müssten die Bakterien in allen Komponenten gefunden werden können.

Um die Verteilung der Bakterien im Vollblut nach Zentrifugation zu erfassen, wurde Vollblut von drei Spendern mit hohen Keimzahlen von *Yersinia enterocolitica* inokuliert und anschließend durch Zentrifugation aufgetrennt. Der Versuch fand im Labormaßstab statt und nicht unter standardisierten Bedingungen des Blutspendedienstes. Die Zentrifugationsvorgaben wurden bis auf den abschließenden Bremsvorgang, der bei der zur Verfügung stehenden Zentrifuge nicht eingestellt werden konnte, eingehalten.

In allen getesteten Komponenten, die leukozyten- und plasmareich waren, wurde ein starker Abfall bzw. eine Eliminierung der Bakterien beobachtet. Besonders im Vollblut konnte ein rapider Rückgang der Keimzahl des plasmidhaltigen Stammes von mehr als drei log-Stufen (um 98,7%) innerhalb von ca. 30 Minuten nach Kontamination des Vollblutes beobachtet werden (**Abbildung 3-27**).

Nach vier Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde eine Reduktion von einer weiteren log-Stufe festgestellt. Insgesamt wurden nach dieser Zeit 99,8% der inokulierten Bakterien nicht wieder gefunden.

Im Plasma konnten bei Spender 1 und 2 keine Bakterien nachgewiesen werden. Es ist einerseits möglich, dass die Bakterien aufgrund ihrer Größe durch die Zentrifugation nicht mehr im Plasma präsent waren. Allerdings wurde im Plasma des dritten Spenders bei einer nur leicht reduzierten Keimzahl im VB noch 11% der nach Fraktionierung gefundenen Bakterien gefunden. In allen Komponenten sind nach Zentrifugation noch alle Arten von Blutzellen zu finden [122]. Somit müsste das im Plasma vorhandene Komplement die Bakterien eliminiert haben. Um die theoretische Verteilung der zum Zeitpunkt 0h vorhandenen Bakterien (297 KBE/ml für Spender 1; 257 KBE/ml für Spender 2) ohne Beeinflussung durch die immunspezifische Abwehr zu verdeutlichen, sind in **Abbildung 4-5** die im Plasma angenommenen, aber eliminierten Keimzahlen in Rot gekennzeichnet.

In den hergestellten EKs wurden im Mittel 0,0026% der Bakterien aus dem direkt nach Inokulation untersuchten Vollblut gefunden. Eine Übertragung von *Yersinia enterocolitica* wäre ohne Leukozytenfiltration demnach rechnerisch bei 5 KBE/ml Vollblut (2500 KBE/500 ml VB) möglich, da nur eine Bakterienzelle in der Komponente überleben müsste. Die in der Literatur postulierten Keimzahlen im Blut eines Spenders reichen von 10 bis 100 KBE/Beutel bis zu 100 KBE/ml [8, 111, 221]. Im Buffy Coat war die Keimzahl der Spender 1 und 2 im Durchschnitt mit ca. 140 KBE/ml etwas mehr als doppelt so hoch wie im EK mit 60 KBE/ml (s. **Abbildung 4-5**).

Spender 3 klagte über Bauchschmerzen und aufgrund der wahrscheinlich geschwächten Immunabwehr durch die Eliminierung einer angenommenen Virusinfektion wurde im Plasma *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen. Bei aktivierter Immunabwehr können nicht nur Komplement und Antikörper, sondern auch Makrophagen beteiligt sein [150], die dann bei Spender 3 eventuell für die Sekundärkontamination durch *Yersinia enterocolitica* nicht mehr im ausreichenden Maße zur Verfügung standen. Insgesamt waren die in den Komponenten detektierten Keimzahlen ggü. Spender 1 und 2 erhöht (s. **Abbildung 4-5**). Es ist hier am deutlichsten zu sehen, dass im BC mit über 60% der Großteil der Bakterien verbleibt, gefolgt von der EK Phase mit über 25%. Die Interaktion der Bakterien mit den Monozyten (Adhäsion, Invasion) könnte für die Anreicherung im BC eine Rolle spielen [154].

Im Plasma wurde nach Verteilung der Bakterien die geringste Bakteriendichte gefunden. Die Verteilung ist ähnlich wie bei den anderen beiden Spendern. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Bakterien sich in allen Phasen wiederfinden. Das Plasma, wie auch schon in vorherigen Versuchen belegt, hat den größten bakteriziden Effekt und kann auch hohe Keimzahlen von *Yersinia enterocolitica* eliminieren.

Im ersten Versuch mit identischen Spendern und etwas geringerem Inokulum wurde in keiner der ausplattierten unverdünnten Komponenten bakterielles Wachstum von *Yersinia enterocolitica* beobachtet.

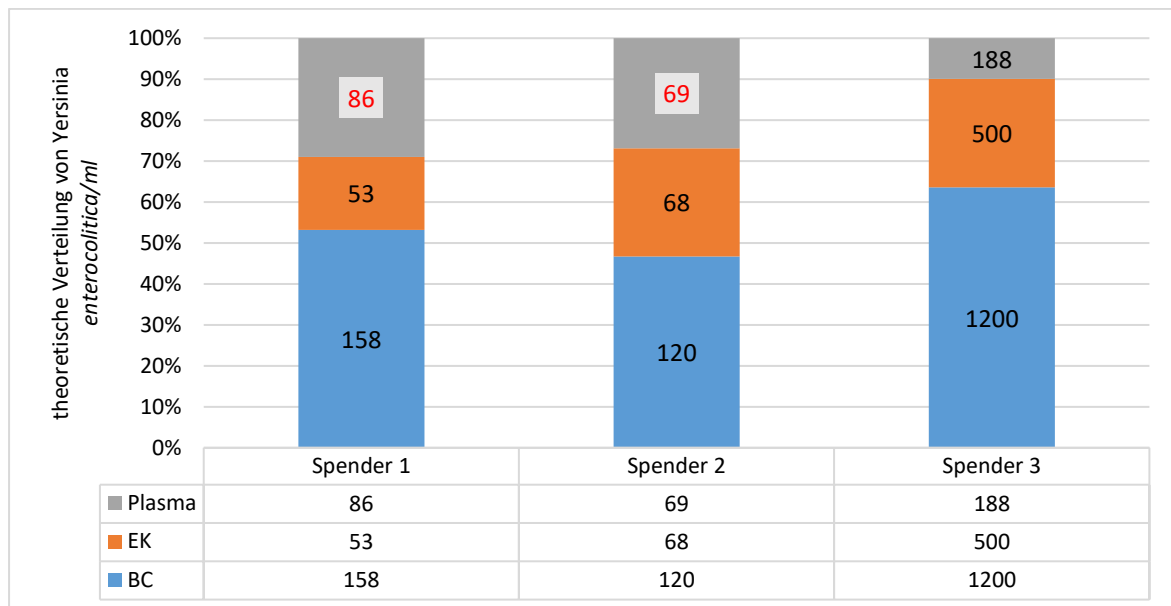


Abbildung 4-5: Verteilung der Bakterien in den Blutphasen nach Zentrifugation.

Die schwarzen Zahlen zeigen ermittelte Keimzahlen, die rote Zahl ist jeweils die errechnete Differenz zwischen der Keimzahl im Vollblut nach 0h und der Summe der in den Komponenten BC und EK wiedergefundenen Mikroorganismen.

Die Buffy-Coat Schicht wurde bei allen drei Spendern aufgrund des geringen Volumens nicht zum TK weiterverarbeitet. Um die Verteilung der Bakterien in der weiteren Verarbeitung der BCs zu TKs beobachten zu können, wurden drei vom DRK Blutspendedienst Frankfurt bezogene Buffy-Coats mit einem Volumen von je ca. 50 ml, in je vier 15 ml Falconröhrchen pro Spender aliquotiert, kontaminiert und daraus die TK-Fractionen durch Zentrifugation hergestellt. In den TK-Komponenten wurde eine Abreicherung der Bakterien um 4 log-Stufen beobachtet.

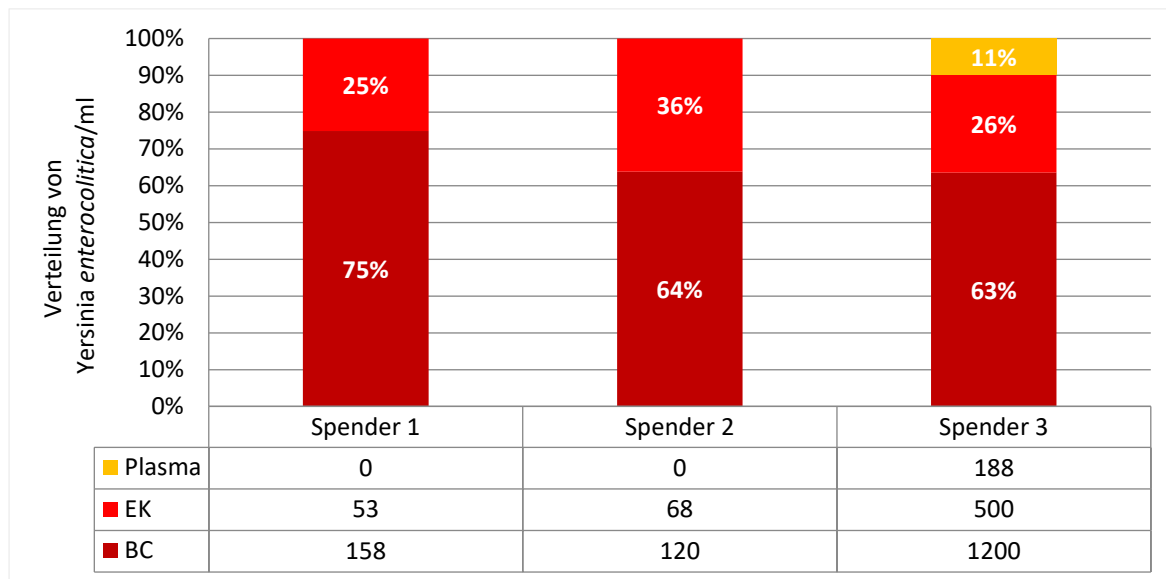


Abbildung 4-6: Verteilung von *Yersinia enterocolitica* in den Blutkomponenten nach Zentrifugation des Vollblutes.

Die Verteilung der Bakterien in den Komponenten Plasma und EK ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Im gesunden Spenderblut kamen nach Inokulation mit Stamm PEI-A-101-02 noch 0,02% der Bakterien im EK an. Im BC wurden 0,05-0,07% der initial inokulierten Bakterien wiedergefunden, also etwas mehr als das Doppelte als im EK. Im Versuch VF Nr. 2 mit BC konnte in den TKs nur noch ein Prozentsatz von im Mittel 0,003% der initial in den BC eingebrachten Keime rechnerisch ermittelt werden.

Bei einer ermittelten mittleren Keimzahl von 140 KBE/ml im Buffy Coat von Spender 1 und 2 nach Vollblut-Fraktionierung hätte die anschließende Weiterverarbeitung zum TK vermutlich zu einer sehr starken Reduktion der Bakterien geführt. In den hergestellten TKs wäre möglicherweise kein bakterielles Wachstum mehr aufgetreten. Denn bei einer Abreicherung von 99,97% im TK aus Versuch VF Nr. 2 (von $1,75 \times 10^5$ KBE/ml initial im BC wurden noch im Mittel fünf KBE/ml im TK gefunden) wären theoretisch noch 0,042 KBE/ml (also 0,003%) im TK aus Versuch VF Nr. 1 gefunden worden). Die Abreicherung im Buffy-Coat und auch im Vollblut (abgesehen von Spender 3) lag mit einer Reduktion von drei log-Stufen in einem vergleichbaren Bereich.

Die TK-Fractionen wurden innerhalb von 30 min direkt nach Herstellung beprobt. Auf den Platten waren nur vereinzelt Kolonien zu finden. Bei gleicher Verteilung der Bakterien in den Schichten wären rechnerisch noch mindestens 116 KBE zu erwarten gewesen (niedrigste Keimzahl im BC 0h von Spender 3 im VF Nr. 2). Durch den Plasmaanteil und die darin enthaltenen unspezifischen Abwehrstoffe kann von einer weiteren Reduktion der Bakterien nach einer üblichen Lagerung der TKs von vier bis fünf Tagen nach Herstellung

[122] ausgegangen werden, da in den hergestellten TKs das Plasma unverdünnt vorlag. Eine Übertragung dieser Annahme auf Routine TKs ist allerdings nur bedingt möglich, da diese mit Plasmaersatz-Lösung aufgefüllt werden und nur noch einen stark verdünnten Plasmaanteil haben. Weitere Versuche wären zur Klärung dieser Frage notwendig.

Ein Großteil der inokulierten Bakterien wurde im VB bzw. BC eliminiert. Trotz maximal möglicher Initialkeimzahl wurden in den abgetrennten Phasen der Spender 1 und 2 für eine exakte Bestimmung der Keimzahl nicht genügend Kolonien gefunden. Eine Tendenz der Verteilung ist jedoch in allen Ansätzen klar erkennbar. Nach der Zentrifugation des VBs reichern sich im BC in etwa doppelt bis dreimal so viele *Yersinia enterocolitica*-Zellen an wie im EK. Nach der Auftrennung des BCs findet sich im BC-Rest in etwa das 5-fache an KBE im Vergleich zum TK. Im VB wird der Großteil der Bakterien durch Zentrifugation des VBs gemeinsam mit den Leukozyten und Thrombozyten in den BC abgetrennt. Aber auch im EK befinden sich noch ca. 25% der nach 0h Inkubation gefundenen *Yersinia enterocolitica*. Hier sind die Überlebenschancen für den Erreger wahrscheinlich durch den geringen Anteil an Plasma besser als im TK, das nach der Zentrifugation des BCs nur noch einzelne Bakterien enthielt (Wachstum in Plasma Kapitel 3.5.4 und 4.5.1 gezeigt, [Gibb 1996]). Hier befand sich der Hauptanteil der Bakterien im BC-Rest, der in der Routine verworfen wird. Ob die Gegenwart der Leukozyten, die sich sowohl im bakterienreichen BC als auch im BC-Rest befanden, ausschlaggebend für die Verteilung war, möglicherweise durch Anlagerung der Bakterienzellen an Leukozyten, bleibt hier ungeklärt [232, 233].

Nach 4 Stunden Inkubation der Bakterien in Buffy-Coat, aus dem anschließend die TKs hergestellt wurden, lag die Anzahl der wiedergefundenen Bakterien im BC bei 13,3 KBE/ml im Mittel. Dieses Ergebnis fällt leicht höher aus als im direkt nach Kontamination aufgetrennten TK mit durchschnittlich 5,3 KBE/ml. Da sich im BC der Hauptanteil an Leukozyten anreichert, müsste bei einer wesentlichen Beteiligung von phagozytierenden Zellen über vier Stunden in dieser Komponente eine höhere Reduktion der Bakterien als im TK stattgefunden haben und der Anteil an Plasma durch die Auftrennung im TK wahrscheinlich sogar etwas geringer war. Deshalb spricht die stärkere Abreicherung im TK für die Aktivität des Plasmas, und nicht für die Eliminierung durch die Leukozyten.

Da bei einer kontaminierten Vollblutspende die Initialkeimzahlen sehr viel niedriger liegen als im Fraktionierungs-Versuch, nach der Auftrennung noch eine sehr effektive Leukozytendepletion erfolgt, ist aus diesen Ergebnissen abgeleitet, die Übertragung von *Yersinia enterocolitica* durch die EK-Komponente sehr gering. Es bleibt aber zu bedenken, dass die Bakterien aus dem Blut eines Spenders schon länger in dessen Körper persistieren und die Immunabwehr umgehen konnten, sodass die Abreicherung im Blut nicht mehr in dem Maße stattfinden kann wie im Versuch gezeigt.

4.7 AUSBLICK

Die Übertragung von *Yersinia enterocolitica* über kontaminierte Lebensmittel und Trinkwasser ist oft publiziert worden [26, 71, 75, 81, 82, 154]. Seit 2001 ist die Yersiniose in Deutschland meldepflichtig [75] und die gemeldeten Fälle werden jährlich vom Robert-Koch-Institut im „Infektionsepidemiologischen Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten“ veröffentlicht. Bis auf die Jahre 2011 und 2015 sind die Zahlen stetig gesunken, wobei eine hohe Anzahl an nicht diagnostizierten Yersiniosen vermutet wird [131].

Im letzten Jahr (2015) erkrankten noch 991 Menschen in Deutschland im spendefähigen Alter zwischen 20 und 69 Jahren an einer Yersiniose [218]. Bei einer durchschnittlichen Spenderate von 3% (ca. 30 Spender) [222] und einem angenommenen subakuten oder symptomlosen Verlauf bei 10% der infizierten Personen [8, 78, 223] haben schätzungsweise 3 infizierte Spender Blut gespendet. Der aktuelle Hämovigilanzbericht von 2015 ist noch nicht veröffentlicht. Dem Paul-Ehrlich-Institut liegen allerdings keine Meldungen einer Übertragung von *Yersinia enterocolitica* durch EK vor. Seit der Einführung der Leukozytendepletion wurde erst ein Transfusionszwischenfall im Jahr 2007 gemeldet, bei dem *Yersinia enterocolitica* auf den Rezipienten übertragen wurde. Diesem Patienten wurde infolge einer Coxarthrose eine Hüftgelenks-Prothese eingesetzt. Der Patient erholte sich, Folgeschäden sind nicht bekannt. Aus den Jahren 1995, 1997 und 1998 vor Einführung der Leukozytenfiltration wird von drei Übertragungen mit tödlichem Ausgang berichtet. Die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung, vor allem nach Leukozytendepletion, ist deshalb als sehr gering einzustufen. In Deutschland ist die Leukozytendepletion obligatorisch, in anderen Ländern, wie zum Beispiel in Italien oder den USA wird sie nur bei bestimmten Indikationen eingesetzt [158]. Eine generelle Leukozytendepletion ist in diesen Ländern aus logistischen, technischen und finanziellen Gründen bzw. wegen der zusätzlichen Herstellung dieser Komponenten in den Blutspendediensten nicht durchsetzbar. In der Literatur findet man den letzten nicht fatalen Zwischenfall aus USA im Jahr 2003. In Italien verstarb eine Frau im Jahr 2015 an einer mit *Yersinia enterocolitica* kontaminierten EK-Komponente. Eine Häufung an Übertragungen durch Blut in diesen Ländern ist in der Literatur nicht zu finden. In den Ländern, in den die Leukozytendepletion eingeführt wurde, wurden mehr Publikationen veröffentlicht. In **Tabelle 1-3** ist zu sehen, dass vor der Einführung der Leukozytendepletion mehr Komplikationen auftraten als danach. Die dokumentierten Zeiträume vor und nach Leukozytendepletion sind in etwa gleich lang.

Eine starke Abreicherung von *Yersinia enterocolitica* wurde bisher nur mit artifiziell kontaminierten Vollbluten und Blutkomponenten beobachtet (eigene Versuche und [96, 181]). Siblini konnte in seiner Arbeit zeigen, dass *Yersinia enterocolitica* nach Kontamination der Vollblute bei 18-stündiger Vorinkubation bei RT nicht vollständig eliminiert wurde. Bei einer kontaminierten Blutspende befindet sich das Bakterium

bereits seit mehreren Stunden bis Tagen im Blut des Spenders (endogene Kontamination). Deshalb ist es möglich, dass eine Vorinkubation eines mit *Yersinia enterocolitica* infizierten Vollblutes nicht zur Reduktion der Bakterien beiträgt.

Dagegen könnten wahrscheinlich Mikroorganismen, meist Kommensalen der Haut, die bei der Blutspende durch die Punktion der Vene in den Vollblutbeutel gelangen (exogene Kontamination) durch die Immunabwehr des Blutes/Spenders möglicherweise durch eine Präinkubation abgereichert werden. Dies lässt sich auf die Aktivität des Komplementsystems zurückführen, was in dieser Arbeit indirekt gezeigt werden konnte. Da *Yersinia enterocolitica* sich bereits im Blut des Spenders befindet, wäre die Leukozytendepletion die einzige Möglichkeit *Yersinia enterocolitica* aus dem Blut zu eliminieren.

Die Beobachtung der verminderten Abreicherung von *Yersinia enterocolitica* bei einer spenderspezifischen vorübergehenden Immunschwächung (s. Spender 3, **Abbildung 3-27**) könnte die Übertragung von *Yersinia* begünstigen. Die Bakterien werden bei diesen Spendern verzögert oder nicht vollständig eliminiert. Demnach besteht eine größere Wahrscheinlichkeit, dass eine vitale Bakterienzelle durch den Leukozytenfilter gelangt. Legt man Versuch VF Nr. 1 zugrunde und eine Verteilung der Bakterien von 25% in die EK-Komponente, würden bei 10 KBE/ml VB (5000 KBE/Beutel VB) 1250 KBE in das EK gelangen und nach LF mit Retentionsrate von 99,9% theoretisch noch eine Bakterienzelle im EKf zu finden sein. Die Verteilung der Bakterien nach Auftrennung kann allerdings nur geschätzt werden.

Im Filtrationsversuch entsprach das Inokulum mit durchschnittlich $5,85 \times 10^4$ KBE/ml nicht den in der Literatur postulierten niedrigen Keimzahlen eines bakteriämischen Spenders [8, 83, 94, 111]. Es wurde keine vollständige Entfernung der Bakterien beobachtet. Ob wenige Bakterien effektiver im Filter adsorbieren, müsste mit weiteren Versuchen geklärt werden. Mit den eingesetzten Keimzahlen im Versuch war eine fast 100%ige Retention möglich. Da ein Bakterium jedoch ausreicht, um anschließend wieder zu hohen Keimzahlen heranzuwachsen und einen Transfusionszwischenfall auszulösen, ist die Leukozytendepletion nicht als Methode zur vollständigen Eliminierung von *Yersinia enterocolitica* aus EKs anzusehen. Die in der Literatur beschriebenen chromosomal- und plasmidkodierte Mechanismen [25, 28, 47, 62] von *Yersinia enterocolitica* werden für das Eindringen in den Wirtsorganismus verantwortlich gemacht. Da sich Umgebungsbedingungen im Darm bzw. in den Peyer Plaques und im Blut unterscheiden, könnte man vermuten, dass sich *Yersinia enterocolitica* in den beiden Matrices mehr oder weniger gut gegen die dort vorherrschende Wirtsabwehr schützen kann [139, 224], zumindest wenn das Bakterium direkt ins Blut gegeben wird (was normalerweise nicht passiert). Allerdings kann das Bakterium auch im Blut überleben, denn immer wieder werden systemische Verläufe und postinfektiöse Folgeerkrankungen durch eine Yersiniose beschrieben. In den hier durchgeführten Versuchen konnte der plasmidhaltige

Stamm mit einer Keimzahl von 20 KBE/ml VB über Nacht im VB bei RT überleben und in zwei von sechs EKs wiedergefunden werden.

Ob die zur Phagozytose befähigten Leukozyten eine Rolle bei der Abreicherung der Bakterien spielen, konnte hier nicht ausreichend geklärt werden, da keine Kontaminationsversuche mit isolierten Leukozyten durchgeführt wurden. Gong vermutet, dass sich die Bakterien in die Leukozyten zurückziehen und dann nach Absterben dieser in plasmaarmem Medium (z.B. EK mit Additivlösung) vermehren können [143]. Gibb fand heraus, dass *Yersinia* bei 37°C sowohl von polymorphkernigen Leukozyten als auch von Monozyten aufgenommen wird, bei 20°C und 4°C jedoch keine Eliminierung der Bakterien stattfinden konnte [85]. Diese Blutzellen scheinen die Bakterien nur bei Körpertemperatur phagozytieren zu können. Allerdings wurde der Plasmidgehalt der eingesetzten Stämme nicht überprüft. Denn YEP+ Zellen besitzen durch das Typ-3 Sekretionssystem einen Mechanismus, der sie vor Phagozytose schützt [62].

Bei der Reduktion von *Yersinia enterocolitica* durch Leukozytendepletion scheinen die Leukozyten nicht maßgeblich an der Eliminierung beteiligt zu sein. Die äußere Bakterienmembran scheint mit dem Filtermaterial direkt in Wechselwirkung zu treten, was aus dem Versuch LF Nr. 4 mit frischen EK zu schlussfolgern ist, in dem keine verbesserte Reduktion bei Anwesenheit von Leukozyten erkennbar war. In den meisten leukozytenreichen Komponenten aus LF 4 fand eine Abreicherung der Bakterienzellzahl während der Inkubationszeit von 4 Stunden statt. Diese enthielten noch Anteile an Plasma bzw. waren noch nicht mit Additivlösung verdünnt. So kann das Plasma an der Reduktion beteiligt gewesen sein.

Aus den Versuchen ergibt sich das Bild, dass die Konzentration des Plasmas, die Größe des Inokulums und die Temperatur eine Rolle in der Entwicklung und für das Überleben von plasmidhaltiger *Yersinia enterocolitica* spielt.

Ein wichtiger Faktor bei der Minimierung des Risikos einer Übertragung von *Yersinia* bei der Transfusion ist die Aufklärung der Bevölkerung und die verbesserte Hygiene bzw. Überwachung bei der Lebensmittelherstellung, v.a. beim Schlachten. Ein wichtiger Punkt hierbei ist die Verbesserung der Nachweisverfahren, um *Yersinia enterocolitica* auch in geringer Keimzahl nachweisen und eine genaue Charakterisierung der Spezies (Serogruppe, Biovar, Pathogenität) vornehmen zu können [116]. Die akuten Symptome einer Yersiniose sind nicht immer eindeutig zuzuordnen. Da Durchfälle verschiedenste Ursachen haben können, bleibt der Besuch beim Arzt aus oder die Erkrankung wird nicht selten falsch diagnostiziert. Die Dunkelziffer der Yersiniose wird deshalb höher eingeschätzt als die offiziell gemeldeten Fälle [225–227].

Schnellmethoden könnten neue transfusionsmedizinische Ansätze zur mikrobiologischen Testung von Blutkomponenten aufzeigen. Durch nicht invasive Messung im Beutelinnern könnten biochemische Veränderungen detektiert werden. Immunmechanismen und Stoffwechselprozesse ändern die Zusammensetzung im Blut geringfügig. Inwiefern die daraus resultierenden Änderungen des Spektrums es zulassen, zusätzliche Abweichungen aufgrund mikrobieller Kontaminationen sicher nachzuweisen, sollte geprüft werden. Diese Methoden könnten die Möglichkeit eröffnen, alle Blutkomponenten kurz vor Transfusion zu testen und das Risiko von transfusionsbedingten bakteriellen Reaktionen weiter zu verringern.

Im Fraktionierungsversuch wurde eine Anreicherung von *Yersinia enterocolitica* im Buffy-Coat Rest bei der TK-Herstellung von allen drei Spendern beobachtet. Der BC- Rest wird üblicherweise nach TK-Herstellung verworfen. Die Testung eines des BC-Rest-Volumens wäre möglich und könnte möglicherweise eine Aussage über die bakterielle Ausgangslage geben und Kontaminationen identifizieren. Ein kultivierungsabhängiger Nachweis von *Yersinia enterocolitica* aus BC-Resten mit geeigneten Nährmedien bzw. der Einsatz von Kulturautomaten wären für die Diagnostik geeignete Verfahren. Vermutlich reichern sich auch andere relevante transfusionsassoziierte Mikroorganismen [228] in der BC- Phase an und könnten ausreichend früh detektiert werden. Eine geeignete Vorgehensweise müsste Inhalt weiterer Untersuchungen sein.

Psychrotolerante Bakterien benötigen in der Kälte eine gewisse Latenzzeit, bis sie in die logarithmische Phase starten. Die Einführung eines mikrobiologischen Tests nach einer definierten Mindestlagerdauer zur Haltbarkeitsverlängerung könnte auch für EKs eine Methode sein, um die Sicherheit für die Empfänger des Blutes zu erhöhen. Die fatalen transfusionsbedingten bakteriellen Infektionen durch *Yersinia enterocolitica* traten meist durch 2 bis 3 Wochen alte EKs auf [83]. TKs werden in Deutschland nach Tag 4 einem mikrobiologischen Schnelltest unterzogen. So kann bei negativem Testergebnis die Haltbarkeitsdauer auf 5 Tage verlängert werden (Votum 38). EKs können bis zu 49 Tagen gelagert werden. Ein Test nach 7 bis 10 Tagen im Kulturautomaten wäre somit möglich. Die Beimpfung von lediglich einer anaeroben Kulturflasche würde für die Untersuchung von EKs wahrscheinlich ausreichen (zur Einsparung von Kosten), da die meisten gefundenen Spezies fakultativ anaerob sind [183]. Auch andere mikrobiologische Methoden sind denkbar, deren Eignung im Vorfeld festgestellt werden müsste.

Anhand der Ergebnisse, der epidemiologischen Daten und der Anzahl an dokumentierten Übertragungen von *Yersinia enterocolitica* durch kontaminierte EKs in den letzten Jahren hat sich das Transfusionsrisiko einer kontaminierten Blutspende so stark reduziert, dass in Ländern, in denen die Leukozytendepletion eingeführt wurde, kein Handlungsbedarf besteht (s. **Tabelle 1-3**). Für die Länder, die nur

indikationsbezogen leukozytendepletierte EKs verabreichen, könnte eine mikrobiologische Kontrolle sinnvoll sein. Der letzte dokumentierte Fall hätte möglicherweise durch eine mikrobiologische Kontrolle des EK vermieden werden können [108]. Auch die Übertragung von anderen relevanten psychrotoleranten Mikroorganismen, die sich möglicherweise nicht im Filter zurückhalten lassen [154] (Dzik berichtete über schlechte Retentionsraten von *Staphylococcus epidermidis* in der Matrix TK) könnte dadurch vermieden werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Yersinia enterocolitica wird durch den Verzehr von kontaminierten Nahrungsmitteln, vor allem durch ungenügend durchgegartes oder rohes Schweinefleisch, aber auch durch verunreinigtes Wasser auf Menschen übertragen. Seit 2001 ist die Yersiniose eine meldepflichtige Zoonose. Die Anzahl der Neuerkrankungen hat sich bei Frauen und Männern im blutspendefähigen Alter seit Erfassung in 2001 von 2276 auf 991 Fälle im Jahr 2015 reduziert.

Weiterhin kann diese Spezies durch die Transfusion von Blut asymptomatischer Spender weitergegeben werden. Für die sinkenden Zahlen von transfusionsbedingten Übertragungen durch *Yersinia enterocolitica* in den letzten Jahren wird die in einigen Ländern eingeführte Leukozytenfiltration von zellhaltigen Blutkomponenten verantwortlich gemacht. Gründe hierfür waren einerseits die Übertragung der Creutzfeld-Jakob-Krankheit zu unterbinden und andererseits Immunreaktionen beim Empfänger durch Spenderleukozyten zu begegnen. Da sich *Y. enterocolitica* an Leukozyten anlagert bzw. in Leukozyten eindringt und dort überlebt, ist eine Abreicherung dieser Bakterien durch die Leukozytenfiltration in Blutkomponenten möglich.

Bei Körpertemperatur exprimiert *Y. enterocolitica* die notwendigen Proteine, um im Wirt überleben und sich vermehren zu können. Die Genloki hierfür liegen auf dem Bakterienchromosom und auf einem Virulenzplasmid (pYV), das essenziell für das Überleben im Wirt ist. In vitro kann es verloren gehen. Die exprimierten Virulenzproteine ermöglichen dem Bakterium sich an Wirtszellen zu adhären und einzudringen. So können sie sich gegen Phagozytose und Komplement behaupten. Apathogene Stämme der Spezies können im Wirtsorganismus nicht überleben.

In der vorliegenden Arbeit wurden plasmidhaltiges und plasmidloses Referenzmaterial von *Y. enterocolitica* des Serotyps O:3 hergestellt. Die Anzahl der lebenden sowie plasmidhaltigen Bakterienzellen wurde erfasst. Zur speziesspezifischen Kontrolle wurde ein plasmidloser Stamm mitgeführt, der chromosomal kodierte Virulenzfaktor ail war hier noch vorhanden. Beide Referenzstämmen wurden aliquotiert tiefgefroren und zeigten über zehn Jahre hinweg stabile Keimzahlen und einen stabilen Plasmidbesitz. Somit eignen sie sich zur Herstellung von standardisierten Bakteriensuspensionen. Die quantitative Bestimmung plasmidhaltiger Zellen war auf Basis der Koloniegröße möglich, da die erhöhte Produktion von auf dem Plasmid kodierten und zur Pathogenität benötigten *Yersinia* outer Proteins (Yops) mit einem leicht verzögertem Wachstum der plasmidhaltigen Kolonien einhergeht. In dieser Arbeit wurde erstmals ein standardisierter pYV-positiver Referenzstamm eingesetzt, um den Einsatz von pathogenen Bakterien zu

verifizieren. In bisher durchgeführten Studien wurden meist Patientenisolat von *Y. enterocolitica* verwendet, die im Vorfeld nicht auf ihren Plasmidgehalt untersucht worden waren.

Die standardisierten Bakteriensuspensionen wurden zur Evaluierung der Leukozytenfilter mit verschiedenen Matrices (Erythrozytenkonzentrat, Additivlösung für Erythrozytenkonzentrat, physiologische Kochsalzlösung), zur Verteilung von *Y. enterocolitica* in Vollblut und seinen Komponenten im Labormaßstab sowie unter Routinebedingungen in den Blutspendediensten genutzt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass sich die Bakterien bei der Zentrifugation zur Herstellung der Blutkomponenten in alle Phasen verteilen. Im Plasma wurden nur noch sehr wenige bis keine Bakterien mehr gefunden. Es wird angenommen, dass die im Plasma enthaltene unspezifische Abwehr des Wirtes (Komplementsystem) *Y. enterocolitica* eliminieren kann.

In Vollblutspenden, die mit dem plasmidhaltigen Referenzstamm von *Y. enterocolitica* kontaminiert worden waren, konnte erst bei Inokulationskeimzahlen größer 20 KBE/ml in zwei von sechs hergestellten Erythrozytenkonzentraten Wachstum detektiert werden. Eine dieser positiven Komponenten war filtriert worden und wies überraschenderweise Wachstum von *Y. enterocolitica* auf. Eine vollständige Eliminierung von *Y. enterocolitica* durch Leukozytendepletion kann demnach nicht erreicht werden.

Im Experiment zur Effektivität der Leukozytendepletion mit unterschiedlichen Matrices wurde eine sehr effektive Retention (99,8%) von plasmidhaltiger *Y. enterocolitica* mit Additivlösung erreicht. In frischen unfiltrierten Erythrozytenkonzentraten konnten Retentionsraten von ca. 98% erfasst werden. Im Trockenfilter mit 0,85%iger NaCl-Lösung wurde eine durchschnittliche Retention von 97% erzielt. Der zum Vergleich eingesetzte plasmidlose *Y. enterocolitica* Stamm zeigte in Kochsalzlösung (26%-86%) und der filtrierten roten Blutkomponente (69%-93%) sehr unterschiedliche und gleichzeitig schlechtere Adhäsionseigenschaften.

Transfusionszwischenfälle mit *Y. enterocolitica* durch kontaminierte Erythrozytenkonzentrate beruhen wahrscheinlich auf den plasmaarmen und dadurch günstigen Umgebungsbedingungen für das Bakterium. Die seit 2001 eingeführte Leukozytenfiltration kann zur Reduktion von *Y. enterocolitica* (Serotyp O:3) beitragen, bietet aber keinen vollständigen Schutz vor einer Übertragung. Diese tendenzielle Abnahme transfusionsbedingter bakterieller Infektionen in Deutschland kann zusätzlich durch die sinkende Prävalenz von Yersiniosen in Deutschland und die damit verbundene sinkende Wahrscheinlichkeit von kontaminierten Blutspenden erklärt werden. Eine nahezu 100-prozentige Sicherheit wäre durch die Einführung eines Bakteriencreenings der Blutkomponenten möglich (z.B. mit Blutkulturautomaten). Hierbei könnten auch andere kontaminierende Mikroorganismen erfasst werden.

6 SUMMARY

Yersinia enterocolitica is commonly transmitted to humans by contaminated food, especially by insufficiently cooked or raw pork, but also via contaminated water. Since 2001, the Yersiniosis is a notifiable zoonosis. The number of new cases of women and men aged between 20 and 69 has been decreased during the last 15 years from 2276 cases to 991 cases.

This species can also be transferred via transfusion of contaminated blood from asymptomatic donors. The reduction of transfusion-transmitted infections due to *Yersinia enterocolitica* in the last years is associated with the implementation of leukodepletion in different countries. Reasons for this implementation were to stop the transmission of Creutzfeldt-Jacob-Disease as well as to avoid immune reactions from donor leukocytes in recipients. Because these bacteria are able to adhere to or invade leukocytes and survive therein, it is possible to reduce the bacterial load in blood components via leukodepletion.

At body temperature *Y. enterocolitica* expresses the necessary proteins to survive and replicate in the host. The genes for virulence are located on both the chromosome and on the plasmid pYV. The plasmid is crucial for survival in the host. However, it can be lost *in vitro*. The expressed proteins for virulence enable the bacteria to adhere to and enter the host cell. They mediate the resistance to phagocytosis and complement killing. In contrast, apathogenic strains of this species cannot prevent being killed from the hosts' immune defence.

In this thesis two bacterial reference strains of *Y. enterocolitica*, serotype O:3 were studied, one plasmid containing virulent strain and one strain lacking the plasmid. Their viable bacterial count and the number of plasmid containing bacterial cells were evaluated. For species specific control the plasmid lacking strain was carried along, because in this strain the chromosomal located *ail* gene was present, too. Both strains were stored deep-frozen in aliquots. They showed stable bacterial counts and plasmid containing cells over ten years. These characteristics made them suitable for the application as standardized bacterial suspensions. Due to the size of colonies, it was possible to quantify plasmid containing bacterial cells. Based on the enhanced production of the plasmid coded *Yersinia* outer proteins (Yop) that are necessary for pathogenicity the replication of these cells was prolonged. Therefore the plasmid containing colonies appeared smaller. This is the first time that a standardized pYV-positive strain was used for experiments to ensure the pathogenicity of the bacteria.

The two reference strains were used to evaluate the leukocyte filters with different matrices (red blood cells (RBCs)/ additive solution for RBCs/ saline) for distribution of *Yersinia enterocolitica* in whole blood and its components in laboratory-scaled experiments as well as under conditions in the blood bank routine.

The results demonstrated the distribution of bacteria in all components. In plasma, only a few or no bacteria could be detected. It is assumed that the immune defence mechanism of the donor (complement) has been eliminated *Yersinia enterocolitica*.

Whole blood, contaminated with the plasmid containing reference strain of *Yersinia enterocolitica*, growth was detected at an initial colony count of 20 cfu/mL in two of six derived red blood components. Even though one of these two components was leukodepleted, it showed bacterial growth. Therefore a complete elimination of *Yersinia enterocolitica* cannot be achieved with this method.

The leukodepletion with a wet filter of plasmid containing *Yersinia enterocolitica* showed an effective retention of 99.8% in additive solution. Together with fresh and not leukodepleted RBCs, *Yersinia* could be retained with a percentage of 98%. Compared with the matrix saline filtered through a dry filter an average retention of 97% could be achieved. The strain lacking the plasmid showed a divergent and lower adhesion to this filter material in saline (26%-86%) as well as in leukodepleted RBCs (69%-93%).

It is assumed that transfusion-transmitted bacterial infections due to contaminated red blood cells with *Yersinia enterocolitica* depend on the plasma poor RBCs and therefore suitable environmental conditions for the bacteria. The leukodepletion, implemented in 2001 may have contributed to a decrease of transfusion transmitted infections with *Yersinia enterocolitica* (serotype O:3) but does not offer full protection. Additionally the downward trend might have been caused by the decreasing prevalence of Yersiniosis in Germany and the related declining likelihood of contaminated blood donations. An almost 100 percent safety might be achieved due to the implementation of a bacterial-screening method of blood components (i.e. culture-automated systems). With this preventive measure other contaminating microorganisms could be detected, too.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bundesinstitut für Risikobewertung. http://www.bfr.bund.de/de/lebensmittelbedingte_krankheitsausbrueche-7608.html.
2. Krämer J. Lebensmittel-Mikrobiologie: 48 Tabellen. 6th ed. Stuttgart: Ulmer; 2011.
3. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology: Fundamentals and frontiers. Washington DC: ASM Press; 1997.
4. Bhakdi S, Hahn H, Miksits K. Pathogenität und Virulenz. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6th ed. Heidelberg: Springer; 2009. p. 11–12.
5. Rosner BM, Stark K, Werber D. Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001–2008. BMC Public Health. 2010;10:337. doi:10.1186/1471-2458-10-337.
6. Bundesinstitut für Risikobewertung. <http://www.bfr.bund.de/de/zoosen.html>.
7. Sihvonen LM, Jalkanen K, Huovinen E, Toivonen S, Corander J, Kuusi M, et al. Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A represent two phylogenetic lineages with differing pathogenicity-related properties. BMC Microbiol. 2012;12:208. doi:10.1186/1471-2180-12-208.
8. Bundesärztekammer, Arbeitskreis Blut, Untergruppe "Bewertung Blutassozierte Krankheitserreger". *Yersinia enterocolitica*. Transfus Med Hemother. 2005;32:138–46. doi:10.1159/000087613.
9. Aleksic S, Bockemühl J. Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen. Immun. Infekt. 1990;178–85.
10. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition: Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition; 2004.
11. Linde H-J, Neubauer H, Meyer H, Aleksic S, Lehn N. Identification of *Yersinia* Species by the Vitek GNI Card. Journal of Clinical Microbiology. 1999;37:211–4.
12. Weagant SD, Feng P. Laboratory Methods-Bacteriological Analytical Manual, chapter 8: *Yersinia enterocolitica* (and other *Yersinia* species). <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072633.htm>. Accessed 9 Nov 2016.
13. Hurst MRH, Becher SA, Young SD, Nelson TL, Glare TR. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. Int J Syst Evol Microbiol. 2011;61:844–9. doi:10.1099/ijs.0.024406-0.
14. Murros-Konttinen A, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Johansson P, Rahkila R, Björkroth J. *Yersinia nurmii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2011;61:2368–72. doi:10.1099/ijs.0.024836-0.
15. Souza RA, Falcao DP, Falcao JP. Emended description of *Yersinia massiliensis*. Int J Syst Evol Microbiol. 2011;61:1094–7. doi:10.1099/ijs.0.021840-0.
16. Murros-Konttinen A, Johansson P, Niskanen T, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Björkroth J. *Yersinia pekkanenii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2011;61:2363–7. doi:10.1099/ijs.0.019984-0.
17. Sprague LD, Scholz HC, Amann S, Busse H-J, Neubauer H. *Yersinia similis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2008;58:952–8. doi:10.1099/ijs.0.65417-0.
18. Parte AC. *Yersinia*. 03.11.2016. <http://www.bacterio.net/yersinia.html>. Accessed 8 Nov 2016.
19. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. Microbes and Infection. 1999;1:323–33. doi:10.1016/S1286-4579(99)80028-8.
20. Bockemühl J, Wong JW. *Yersinia*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition: Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition; 2004.
21. Uliczka F. *Yersinia enterocolitica*O: 3 — Was macht diesen Serotyp so erfolgreich? Biospektrum. 2012;18:339. doi:10.1007/s12268-012-0187-7.

22. Rosner BM. Yersiniose. In: Robert-Koch-Institut, editor. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für meldepflichtige Krankheiten für 2014; 2015. p. 221–225.
23. Thoerner P, Bin Kingombe CI, Bogli-Stuber K, Bissig-Choisat B, Wassenaar TM, Frey J, Jemmi T. PCR Detection of Virulence Genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and Investigation of Virulence Gene Distribution. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69:1810–6. doi:10.1128/AEM.69.3.1810-1816.2003.
24. Tennant SM, Grant TH, Robins-Browne RM. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2003;38:127–37. doi:10.1016/S0928-8244(03)00180-9.
25. Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: The Carisma Continues. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997;10:257–76.
26. Nesbakken T. *Yersinia enterocolitica*: Kapitel 11. In: Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL, editors. Food-borne pathogens: Microbiology and molecular biology. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press; 2008. p. 223–249.
27. Bhagat N, Viridi JS. Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;266:177–83. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00524.x.
28. Dube P. Interaction of *Yersinia* with the Gut: Mechanisms of Pathogenesis and Immune Evasion. In: Sasakawa C, editor. Molecular mechanisms of bacterial infection via the Gut. Heidelberg u.a.: Springer; 2009. p. 61–91.
29. Bliska JB, Falkow S. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89:3561–5. doi:10.1073/pnas.89.8.3561.
30. Pierson DE, Falkow S. The ail Gene of *Yersinia enterocolitica* Has a Role in the Ability of the Organism To Survive Serum Killing. *Infection and Immunity*. 1993;61:1846–52.
31. Feng P, Keasler SP, Hill WE. Direct identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by polymerase chain reaction amplification. *Transfusion*. 1992;32:850–4.
32. Wren BW, Tabaqchali S. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. *Lancet*. 1990;336:693.
33. Autenrieth IB, Firsching R. Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study. *Journal of Medical Microbiology*. 1996;44:285–94. doi:10.1099/00222615-44-4-285.
34. Brett SJ, Mazurov AV, Charles IG, Tite JP. The invasin protein of *Yersinia* spp. provides co-stimulatory activity to human T cells through interaction with beta 1 integrins. *Eur J Immunol*. 1993;23:1608–14. doi:10.1002/eji.1830230732.
35. Schulte R, Kerneis S, Klinker S, Bartels H, Preger S, Kraehenbuhl J-P, et al. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. *Cell Microbiol*. 2000;2:173–85. doi:10.1046/j.1462-5822.2000.00047.x.
36. ITGB1 integrin subunit beta 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3688>. Accessed 14 Oct 2016.
37. Heise T, Dersch P. Interaktion mit Wirtszellen – individuell: Enteropathogene Yersinien. *Biospektrum*. 2007;13:258–9.
38. Uliczka F, Pisano F, Schaake J, Stolz T, Rohde M, Fruth A, et al. Unique cell adhesion and invasion properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most frequent cause of human Yersiniosis. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002117. doi:10.1371/journal.ppat.1002117.
39. Schindler MKH, Schutz MS, Muhlenkamp MC, Rooijackers SHM, Hallstrom T, Zipfel PF, Autenrieth IB. *Yersinia enterocolitica* YadA mediates complement evasion by recruitment and inactivation of C3 products. *J Immunol*. 2012;189:4900–8. doi:10.4049/jimmunol.1201383.

40. Heise T, Dersch P. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extra-cellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:3375–80. doi:10.1073/pnas.0507749103.
41. Boland A, Cornelis GR. Interaction of *Yersinia* with Host Cells. In: Oelschlaeger TA, Hacker J, editors. *Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells: Subcellular Biochemistry*. Boston, MA: Springer US; 2000. p. 343–382. doi:10.1007/978-1-4757-4580-1_14.
42. Iriarte M, Cornelis GR. Identification of SycN, YscX, and AscY, Three New Elements of the *Yersinia* Yop Virulon. *J Bacteriol*. 1999;181:675–80.
43. Cornelis G, Sluiter C, Rouvroit CL de, Michiels T. Homology between virF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J Bacteriol*. 1989;171:254–62.
44. Wattiau P, Cornelis GR. Identification of DNA sequences recognized by VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* yop regulon. *J. Bacteriol*. 1994;176:3878–84. doi:10.1128/jb.176.13.3878-3884.1994.
45. Lambert dRC, Sluiter C, Cornelis GR. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology*. 1992;6:395–409.
46. Cornelis GR, Wolf-Watz H. The *Yersinia* Yop virulon: A bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol*. 1997;23:861–7. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.2731623.x.
47. Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, et al. The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:1315–52.
48. Brubaker RR. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae. *Clin. Microbiol. Rev*. 1991;4:309–24. doi:10.1128/CMR.4.3.309.
49. Li H, Bhaduri S, Magee WE. Maximizing Plasmid Stability and Production of Released Proteins in *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64:1812–5.
50. Galindo CL, Rosenzweig JA, Kirtley ML, Chopra AK. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *Journal of Pathogens*. 2011;2011:182051. doi:10.4061/2011/182051.
51. Bleves S, Cornelis GR. How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. *Microbes and Infection*. 2000;2:1451–60.
52. Hagendorf U, Bartocha W, Feuerpfeil I, Diehl K, Hummel A, López-Pila J. Mikrobiologische Untersuchungen zur seuchenhygienischen Bewertung naturnaher Abwasserbehandlungsanlagen. https://www.google.de/search?q=grundwassernachweis&ie=utf-8&oe=utf-8&gws_rd=cr&ei=Ygs-jWKfsMMSlsgHMwY3IAg#q=nachweis. Accessed 9 Nov 2016.
53. Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M, Blom AM, Skurnik M, Meri S, Isberg RR. *Yersinia enterocolitica* Serum Resistance Proteins YadA and Ail Bind the Complement Regulator C4b-Binding Protein. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000140. doi:10.1371/journal.ppat.1000140.
54. Groß U. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie: 129 Tabellen*. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2009.
55. Haas R. *Molekulare Infektionsbiologie: Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Zellen*. Heidelberg u.a.: Spektrum Akad. Verl.; 2000.
56. Schmid A, Neumayer W, Trulzsch K, Israel L, Imhof A, Roessle M, et al. Cross-talk between Type Three Secretion System and Metabolism in *Yersinia*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:12165–77. doi:10.1074/jbc.M900773200.
57. Fowler JM, Brubaker RR. Physiological Basis of the Low Calcium Response in *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity*. 1994;62:5234–41.
58. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012.

59. Bockelmann U, Dorries H-H, Ayuso-Gabella MN, Salgot de Marçay M, Tandoi V, Levantesi C, et al. Quantitative PCR monitoring of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in three European artificial groundwater recharge systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75:154–63. doi:10.1128/AEM.01649-08.
60. Hinnebusch BJ. *Yersinia: Systems biology and control*. Norfolk: Caister Acad. Press; 2012.
61. Ekaterina Edle von Dall'Armi. Systematische Analyse der Interaktionen von Proteinen des *Yersinia enterocolitica* pYV Virulenzplasmids; 2011.
62. Cornelis GR. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:742–52. doi:10.1038/nrm932.
63. Mueller CA, Broz P, Muller SA, Ringler P, Erne-Brand F, Sorg I, et al. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*. 2005;310:674–6. doi:10.1126/science.1118476.
64. Galan JE, Wolf-Watz H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. 2006;444:567–73. doi:10.1038/nature05272.
65. Viboud GI, Bliska JB. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:69–89. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121320.
66. Bhaduri S, Smith JL. Virulence Plasmid (pYV)-Associated Expression of Phenotypic Virulent Determinants in Pathogenic *Yersinia* Species: A Convenient Method for Monitoring the Presence of pYV under Culture Conditions and Its Application for Isolation/Detection of *Yersinia pestis* in Food. *Journal of Pathogens*. 2011;2011:1–9. doi:10.4061/2011/727313.
67. Prpic JK, Robins-Browne RM, Davey RB. *In Vitro* Assessment of Virulence in *Yersinia enterocolitica* and Related Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985;22:105–10.
68. Prpic JK, Robins-Browne RM, Davey RB. Differentiation Between Virulent and Avirulent *Yersinia enterocolitica* Isolates by Using Congo Red Agar. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983;18:486–90.
69. Bhaduri S, Turner-Jones C, and Lachica RV. Convenient Agarose Medium for Simultaneous Determination of the Low-Calcium Response and Congo Red Binding by Virulent Strains of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991;29.
70. Riley G, Toma S. Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* by Using Congo Red-Magnesium Oxalate Agar Medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989;27:213–4.
71. Bari ML, Hossain MA, Isshiki K, Ukuku D. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. *Journal of Pathogens*. 2011;2011:420732. doi:10.4061/2011/420732.
72. Neubauer H, Sprague LD, Hensel A, Aleksic S, Meyer H. Specific detection of plasmid bearing *Yersinia* isolates by PCR. *Clin. Lab*. 2000;46:583–7.
73. Wang J-Z, Duan R, Liang J-R, Huang Y, Xiao Y-C, Qiu H-Y, et al. Real-time TaqMan PCR for *Yersinia enterocolitica* detection based on the ail and foxA genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52:4443–4. doi:10.1128/JCM.02528-14.
74. Bhaduri S, PICKARD AR. A Method for Isolation of Chromosomal and Plasmid DNA from *Yersinia enterocolitica* for Simultaneous Amplification by Polymerase Chain Reaction: A possible Model for other Bacteria. *J Rapid Methods Auto Microbiol*. 1995;4:107–13. doi:10.1111/j.1745-4581.1995.tb00113.x.
75. Bockemühl J, Roggentin P. Enterale Yersiniosen. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 2004. doi:10.1007/s00103-004-0865-9.
76. Neuhaus K, Anastasov N, Kaberdin V, Francis KP, Miller VL, Scherer S. The AGUAAA motif in cspA1/A2 mRNA is important for adaptation of *Yersinia enterocolitica* to grow at low temperature. *Molecular Microbiology*. 2003;50:1629–45. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03795.x.
77. Zechner K. Die Verbreitung der Yersiniose beim Menschen im Großraum München unter Berücksichtigung von Schweinefleisch und Schlachtnebenprodukten als mögliche Infektionsquelle. München; 2003.

78. Koch CU. Ein Beitrag zur Epidemiologie und Verbreitung von pathogenen *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 in Münchener Metzgereien. München; 2003.
79. Tauxe RV, Wauters G, Goossens V, van Noyen R, Vandepitte J, Martin SM, et al. *YERSINIA ENTEROCOLITICA* INFECTIONS AND PORK: THE MISSING LINK. *The Lancet*. 1987;1129–32.
80. Longenberger AH, Gronostaj MP, Yee GY, Johnson LM, Lando JF, Voorhees RE, et al. *Yersinia enterocolitica* infections associated with improperly pasteurized milk products: southwest Pennsylvania, March–August, 2011. *Epidemiol Infect*. 2014;142:1640–50. doi:10.1017/S0950268813002616.
81. Määttä J, Lehto M, Kuisma R, Kymalainen H-R, Maki M. Microbiological quality of fresh-cut carrots and process waters. *J Food Prot*. 2013;76:1240–4. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-550.
82. MacDonald E, Heier BT, Nygård K, Stalheim T, Cudjoe KS, Skjerdal T, et al. *Yersinia enterocolitica* Outbreak Associated with Ready-to-Eat Salad Mix, Norway, 2011. *Emerg. Infect. Dis*. 2012;18:1496–9. doi:10.3201/eid1809.120087.
83. Guinet F, Carniel E, Leclercq A. Transfusion-transmitted *Yersinia enterocolitica* sepsis. *Clin Infect Dis*. 2011;53:583–91. doi:10.1093/cid/cir452.
84. Ramirez-Arcos S, Perkins H, Kou Y, Mastronardi C, Kumaran D, Taha M, et al. Bacterial growth in red blood cell units exposed to uncontrolled temperatures: challenging the 30-minute rule. *Vox Sanguinis*. 2013;105:100–7. doi:10.1111/vox.12027.
85. Gibb AP, Martin KM, Davidson GA, Walker B, Murphy WG. Modeling the growth of *Yersinia enterocolitica* in donated blood. *Transfusion*. 1994;34:304–10. doi:10.1046/j.1537-2995.1994.34494233577.x.
86. Koning-Ward T de, Robins-Browne RM. A novel mechanism of urease regulation in *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett*. 1997:221–6.
87. Sebbane F, Mandrand-Berthelot M-A, Simonet M. Genes Encoding Specific Nickel Transport Systems Flank the Chromosomal Urease Locus of Pathogenic *Yersinia* Species. *J Bacteriol*. 2002;184:5706–13. doi:10.1128/JB.184.20.5706-5713.2002.
88. Ruckdeschel K. Immunomodulation of Macrophages by Pathogenic *Yersinia* Species. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2002;50:131–7.
89. Aepfelbacher M, Zumbihl R, Ruckdeschel K, Jacobi CA, Barz C, Heesemann J. The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense. *Biol Chem*. 1999;380:795–802. doi:10.1515/BC.1999.099.
90. Pujol C, Bliska JB. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Immunol*. 2005;114:216–26. doi:10.1016/j.clim.2004.07.013.
91. Deuretzbacher A, Czymmeck N, Reimer R, Trulzsch K, Gaus K, Hohenberg H, et al. Beta1 integrin-dependent engulfment of *Yersinia enterocolitica* by macrophages is coupled to the activation of autophagy and suppressed by type III protein secretion. *J Immunol*. 2009;183:5847–60. doi:10.4049/jimmunol.0804242.
92. Montag T. Pathogenitätsverhalten von Oberflächenstrukturen bei *Y. enterocolitica* 2003. *Langen*.
93. Wagner SJ. Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sanguinis*. 2004;86:157–63.
94. Korsak J. Transfusion-Associated Bacterial Sepsis. In: Jorge Monserrat, Alfredo Prieto, David Díaz, Eduardo Reyes, Melchor Álvarez de Mon, Miguel-Angel Sánchez, Raúl de Pablo, editors. *Cellular and Molecular Markers of Outcome in Septic Shock*: INTECH Open Access Publisher; 2012. doi:10.5772/28129.
95. Shepel M, Boyd J, Luider J, Gibb AP. Interaction of *Yersinia enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* with platelets. *Journal of Medical Microbiology*. 2001;50:1030–8. doi:10.1099/0022-1317-50-12-1030.

96. Siblini L, Lafeuillade AR, Le Petit J-C, Pozzetto B. Reduction of *Yersinia enterocolitica* load in deliberately inoculated blood: the effects of blood prestorage temperature and WBC filtration. *Transfusion*. 2002;42:422–7.
97. Leclercq A, Martin L, Vergnes ML, Ounnoughene N, Laran J-F, Giraud P, Carniel E. Fatal *Yersinia enterocolitica* biotype 4 serovar O:3 sepsis after red blood cell transfusion. *Transfusion*. 2005;45:814–8. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04363.x.
98. World Health Organization. Blood Donor Selection: Guidelines on Assessing Donor Suitability for Blood Donation. Geneva: World Health Organization; 2012.
99. Montag T, Nicol S-B, Schurig U, Heiden M, Huber H, Sanzenbacher R, et al. Microbial safety of cell based medicinal products--what can we learn from cellular blood components? *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:963–5. doi:10.1515/CCLM.2008.175.
100. Bradley RM, Gander RM, Patel SK, Kaplan HS. Inhibitory effect of 0 degree C storage on the proliferation of *Yersinia enterocolitica* in donated blood. *Transfusion*. 1997;37:691–5. doi:10.1046/j.1537-2995.1997.37797369443.x.
101. Centers for Disease Control and Prevention. Red Blood Cell Transfusions Contaminated With *Yersinia enterocolitica*—United States, 1991-1996, and Initiation of a National Study to Detect Bacteria-Associated Transfusion Reactions. *JAMA*. 1997;278:553–6. doi:10.1001/jama.1997.03550030036016.
102. Arduino MJ, Bland LA, Tipple MA, Aguero SM, Favero MS, Jarvis WR. Growth and Endotoxin Production of *Yersinia enterocolitica* and Enterobacter agglomerans in Packed Erythrocytes. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989;27:1483–5.
103. Heesemann J. Anzahl der pYV Plasmidkopien pro *Yersinia enterocolitica* Zelle 11.02.2015.
104. Walther-Wenke G. Incidence of bacterial transmission and transfusion reactions by blood components. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:919–25. doi:10.1515/CCLM.2008.151.
105. AuBuchon JP, Högman CF, Nusbacher J. White cell reduction and bacterial proliferation: Letters to the editor. *Transfusion*. 1993;33:533–4.
106. National Health Service Blood and Transplant NHSBT. Annual Shot Report. <http://www.shotuk.org/shot-reports/report-summary-and-supplement-2012/>. Accessed 14 Nov 2016.
107. Agence française de sécurité sanitaire de produits de santé. Annual Haemovigilance France 2009.
108. Frati P, Busardo FP, Di Stefano MA, Neri M, Sessa F, Fineschi V. A fatal case of post-transfusion sepsis caused by *Yersinia enterocolitica* after delivery. *Blood transfusion*. 2015;13:528–31. doi:10.2450/2015.0209-14.
109. Fineschi V. case report *Yersinia enterocolitica*, Nachfrage leukodepletion.
110. Sterility: General Chapter 2.6.1. In: European Pharmacopoeia 8th Edition; 1964. p. 175–178.
111. Montag T. Strategies of bacteria screening in cellular blood components. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:926–32. doi:10.1515/CCLM.2008.176.
112. Müller TH, Mohr H, Montag T. Methods for the detection of bacterial contamination in blood products. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:933–46. doi:10.1515/CCLM.2008.154.
113. Welby-Sellenriek PL, Keller DS, Ferrett RJ, Storch GA. Comparison of the BacT/Alert FAN Aerobic and the Difco ESP 80A Aerobic Bottles for Pediatric Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;35:1166–71.
114. Smith JA, Bryce EA, Ngui-Yen J, Roberts FJ. Comparison of BACTEC 9240 and BacT/Alert blood culture systems in an adult hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33.
115. Bhaduri S, Cottrell B. A simplified sample preparation method from various foods for PCR detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*: a possible model for other food pathogens. *Mol Cell Probes*. 1998;12:79–83. doi:10.1006/mcpr.1998.0155.
116. Bundesinstitut für Risikobewertung. Yersinien in Lebensmitteln: Empfehlungen zum Schutz vor Infektionen - Stellungnahme Nr. 002/2013 des BfR vom 18. Januar 2013. Accessed 16 Nov 2016.

-
117. Gürtler M, Alter T, Kasimir S, Linnebur M, Fehlhaber K. *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. J. FOOD PROTECT. 2005;68:850–4.
 118. Knödl C. Etablierung und Validierung eines kombinierten Verfahrens aus kulturellen Methoden und der PCR zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica* in Lebensmitteln. München; 2008.
 119. Bhaduri S, Cottrell B, Pickard AR. Use of a single procedure for selective enrichment, isolation, and identification of plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* of various serotypes from pork samples. Applied and Environmental Microbiology. 1997;63:1657–60.
 120. Hartmann B. Entwicklung einer Real-Time PCR-Nachweismethode für *Yersinia enterocolitica*. München; 2007.
 121. Neumeister B, editor. Mikrobiologische Diagnostik; 2009.
 122. Bundesärztekammer. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie), Zweite Richtlinienanpassung 2010; 2010.
 123. Bundesinstitut für Risikobewertung. Yersinien - BfR. <http://www.bfr.bund.de/de/yersinien-54364.html>. Accessed 16 Nov 2016.
 124. Bundesinstitut für Risikobewertung. EU-Zoonosenbericht. Accessed 16 Nov 2016.
 125. RKI - Infektionsepidemiologisches Jahrbuch. 24.11.2016. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/jahrbuch_node.html. Accessed 24 Nov 2016.
 126. Robert-Koch-Institut, editor. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für meldepflichtige Krankheiten für 2014; 2015.
 127. Heinrich-Böll-Stiftung, Bund für Umwelt- und Naturschutz Deutschland, Le Monde diplomatique. Fleischatlas 2014. 6th ed.; 2015.
 128. Heinrich-Böll-Stiftung, Bund für Umwelt- und Naturschutz Deutschland, Le Monde diplomatique. Fleischatlas 2016 Deutschland Regional. 1st ed.; 2016.
 129. Verband der Fleischwirtschaft. Deutschland Schweinefleisch Versorgungsbilanz 2001-2014. http://www.v-d-f.de/zahlen_daten_fleischwirtschaft/deutschland/. Accessed 16 Nov 2016.
 130. ECDC Surveillance Report. Annual epidemiological report 2014: Food- and waterborne diseases and zoonoses. 2014.
 131. Alpers K, Stark K, Hellenbrand W, Ammon A. Zoonotische Infektionen beim Menschen. Übersicht über die epidemiologische Situation in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2004;47:622–32. doi:10.1007/s00103-004-0867-7.
 132. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens (Transfusionsgesetz-TFG): TFG; 01.07.1998.
 133. Kiefel V, editor. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen ; Therapie ; Methodik. 4th ed. Berlin Heidelberg u.a.: Springer; 2011.
 134. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. Transfusionsmedizin: Grundlagen - Therapie - Methodik. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer; 2004.
 135. Singbartl G, Walther-Wenke G. Transfusionspraxis. 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
 136. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G, editors. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. Berlin: Springer; 2014.
 137. Heinzeller T, Büsing CM. Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg: 47 Tabellen. Stuttgart u.a.: Thieme; 2001.
 138. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie. 31st ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011.
 139. Michl M. BASICS Hämatologie. 4th ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2016.
 140. Karger R, Kretschmer V. Inline-filtration. Transfusion and Apheresis Science. 2002;27:137–52.

-
141. Paul-Ehrlich-Institut. Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Erythrozytenkonzentraten, Thrombozytenkonzentraten und Gefrorenem Frischplasma Abwehr von Arzneimittelrisiken: Stufe 1 (vom 18. Januar 1999) Stufe 2 (vom 20. Juni 2000). Bundesanzeiger. 1999;1657.
142. Bundesärztekammer. Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaprodukten - 4. aktualisierte und überarbeitete Auflage, 2014. 2014.
143. Gong J, Rawal BD, Högman CF, Vyas GN, Nilsson B, Gustafsson I. Complement Killing of *Yersinia enterocolitica* and Retention of the Bacteria by Leucocyte Removal Filters. Vox Sang. 1994;66:166–70.
144. Gibb AP, Poling N, Murphy WG. Failure to kill *Yersinia enterocolitica* by plasma diluted to the concentration found in red cell units. Journal of Clinical Pathology. 1996;49:434–6. doi:10.1136/jcp.49.5.434.
145. van der Meer PF. PAS or plasma for storage of platelets? A concise review. Transfus Med. 2016;26:339–42. doi:10.1111/tme.12325.
146. Robert Koch-Institut. Festlegung der Haltbarkeitsfrist von Thrombozytenkonzentraten mit dem Ziel der Reduktion lebensbedrohlicher septischer Transfusionsreaktionen durch bakterielle Kontamination: Bei der 66. Sitzung des Arbeitskreises Blut am 9. Juni 2008 wurde folgendes Votum (V 38) verabschiedet. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2008;51:1484. doi:10.1007/s00103-008-0723-2.
147. Autenrieth SE, Linzer T-R, Hiller C, Keller B, Warnke P, Koberle M, et al. Immune evasion by *Yersinia enterocolitica*: differential targeting of dendritic cell subpopulations in vivo. PLoS Pathog. 2010;6:e1001212. doi:10.1371/journal.ppat.1001212.
148. Dhar MS, Viridi JS. Strategies used by *Yersinia enterocolitica* to evade killing by the host: thinking beyond Yops. Microbes and Infection. 2014;16:87–95. doi:10.1016/j.micinf.2013.11.002.
149. Bliska JB, Wang X, Viboud GI, Brodsky IE. Modulation of innate immune responses by *Yersinia* type III secretion system translocators and effectors. Cell Microbiol. 2013;15:1622–31. doi:10.1111/cmi.12164.
150. Kaufmann SHE. Basiswissen Immunologie. Berlin: Springer; 2014.
151. Oelschlaeger TA, Hacker J, editors. Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells: Subcellular Biochemistry. Boston, MA: Springer US; 2000.
152. Schütt C, Bröker B. Grundwissen Immunologie. s.l.: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
153. China B, Sory M-P, N'Guyen BT, Bruyere M de, Cornelis GR. Role of the YadA Protein in Prevention of Opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b Molecules. Infection and Immunity. 1993;61:3129–36.
154. Dzik W. Use of leukodepletion filters for the removal of bacteria. Immunol Invest. 1995;24:95–115.
155. American Association of Blood Banks. *Yersinia enterocolitica*. Transfusion. 2009;49:209S-211S.
156. Wortham ST, Ortolano GA, Wenz B. A brief history of blood filtration: clot screens, microaggregate removal, and leukocyte reduction. Transfus Med Rev. 2003;17:216–22.
157. Bassuni WY, Blajchman MA, Al-Moshary MA. Why implement universal leukoreduction? Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy. 2008;1:106–23. doi:10.1016/S1658-3876(08)50042-2.
158. Singh S, Kumar A. Leukocyte depletion for safe blood transfusion. Biotechnol J. 2009;4:1140–51. doi:10.1002/biot.200800182.
159. Carson JL, Berlin JA. Will we ever know if leukoreduction of red blood cells should be performed? Can J Anaesth. 2004;51:407–10. doi:10.1007/BF03018300.
160. New Zealand Blood Service. Haemovigilance Annual Report 2008. Wellington; 2008.
161. Paul-Ehrlich-Institut. HÄMOVIGILANZ-BERICHT DES PAUL-EHRLICH-INSTITUTS 2011/12: Auswertung der Meldungen von schwerwiegenden Transfusionsreaktionen nach § 63 c AMG. 2013.
162. Funk MB, Lohmann A, Guenay S, Henseler O, Heiden M, Hanschmann K-MO, Keller-Stanislawski B. Transfusion-Transmitted Bacterial Infections - Haemovigilance Data of German Blood Establishments (1997-2010). Transfus Med Hemother. 2011;38:266–71. doi:10.1159/000330372.
163. Lohman A. Transfusionszwischenfälle mit *Yersinia enterocolitica* 28.12.2011.
-

-
164. New Zealand Blood Service. Haemovigilance Annual Report 2010. Wellington; 2010.
165. Andreu G, Morel P, Forestier F, Debeir J, Rebibo D, Janvier G, Herve P. Hemovigilance network in France: Organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. *Transfusion*. 2002;42:1356–64. doi:10.1046/j.1537-2995.2002.00202.x.
166. Beckmann N, Seghatchian J. Monitoring universal leucodepletion performance: the current issues within components production and testing. *Transfusion and Apheresis Science*. 2001;24:233–6.
167. Perez Trallero E, Cilla G, Lopez-Lopategui C, Arratibel C. Fatal septicemia caused by *Yersinia enterocolitica* in thalassemia major. *Pediatr Infect Dis*. 1986;5:483–5.
168. Bjune G, Ruud TE, Eng J. Bacterial shock due to transfusion with *Yersinia enterocolitica* infected blood. *Scand J Infec Dis*. 1984;16:411–2.
169. Jacobs J, Jamaer D, Vandeven J, Wouters M, Vermeylen C, Vandepitte J. *Yersinia enterocolitica* in Donor Blood: a Case Report and Review. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989;27:1117–21.
170. Swissmedic. Haemovigilance Jahresbericht 2013; 2014.
171. Australian and New Zealand Society of Blood Transfusion Ltd. Guidelines for the administration of blood products 2nd Edition. Sydney; 2011.
172. Mizuno J. Use of microaggregate blood filters instead of leukocyte reduction filters to purify salvaged, autologous blood for re-transfusion during obstetric surgery. *J Anesth*. 2013;27:645–6. doi:10.1007/s00540-013-1579-7.
173. Dzik S. Leukodepletion blood filters: filter design and mechanisms of leukocyte removal. *Transfus Med Rev*. 1993;7:65–77.
174. Högman CF, Gong J, Hambræus A, Johansson CS, Eriksson L. The role of white cells in the transmission of *Yersinia enterocolitica* in blood components. *Transfusion*. 1992;32:654–7.
175. Kim DM, Brecher ME, La Bland, Estes TJ, McAllister SK, Aguero SM, et al. Prestorage removal of *Yersinia enterocolitica* from red cells with white cell-reduction filters. *Transfusion*. 1992;32:658–62. doi:10.1046/j.1537-2995.1992.32792391041.x.
176. Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz RA. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med*. 1989;169:1733–45.
177. van Oss CJ, Gillman CF. Phagocytosis as a surface phenomenon. II. Contact angles and phagocytosis of encapsulated bacteria before and after opsonization by specific antiserum and complement. *J Reticuloendothel Soc*. 1972;12:497–502.
178. van Oss CJ, Gillman CF. Phagocytosis as a surface phenomenon. Contact angles and phagocytosis of non-opsonized bacteria. *J Reticuloendothel Soc*. 1972;12:283–92.
179. Rawal BD, Vyas GN. Complement-mediated bactericidal action and the removal of *Yersinia enterocolitica* by white cell filters. *Transfusion*. 1993;33:536.
180. Wagner SJ, Robinette D, Dodd R. Factors affecting *Yersinia enterocolitica* (serotype O:8) viability in deliberately inoculated blood. *Transfusion*. 1993;33:713–6.
181. Buchholz DH, AuBuchon JP, Snyder EL, Kandler R, Edberg S, Piscitelli V, et al. Removal of *Yersinia enterocolitica* from AS-1 red cells. *Transfusion*. 1992;32:667–72. doi:10.1046/j.1537-2995.1992.32792391043.x.
182. Paul-Ehrlich-Institut. HÄMOVIGILANZ-BERICHT DES PAUL-EHRLICH-INSTITUTS 2013/14: Auswertung der Meldungen von schwerwiegenden Transfusionsreaktionen nach § 63 i AMG. 2015.
183. Montag T, Lange H, Schmidt U, Strobel J, Exner M. Bakterielle Kontamination von Blutkomponenten. In: Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, editor. *Yersinia enterocolitica*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1999. p. 132–142. doi:10.1007/978-3-662-38283-7_25.
184. Montag T. Möglichkeiten und Grenzen des Screenings von Thrombozyten-Konzentraten auf bakterielle Kontamination Perspectives and limitations in the bacterial screening of platelet concentrates. *LaboratoriumsMedizin*. 2006;30:60–5. doi:10.1515/JLM.2006.010.
-

-
185. Jacobs MR, Good CE, Lazarus HM, Yomtovian RA. Relationship between bacterial load, species virulence, and transfusion reaction with transfusion of bacterially contaminated platelets. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1214–20. doi:10.1086/529143.
186. Walther-Wenke G, Doerner R, Montag T, Greiss O, Hornei B, Knels R, et al. Bacterial contamination of platelet concentrates prepared by different methods: results of standardized sterility testing in Germany. *Vox Sanguinis*. 2006;90:177–82. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00753.x.
187. Korte D de, Marcellis J. Platelet concentrates: Reducing the risk of transfusion-transmitted bacterial infections. *IJCTM*. 2014;29. doi:10.2147/IJCTM.S40037.
188. Müller B, Walther-Wenke G, Kalus M, Alt T, Bux J, Zeiler T, Schottstedt V. Routine bacterial screening of platelet concentrates by flow cytometry and its impact on product safety and supply. *Vox Sanguinis*. 2015;108:209–18. doi:10.1111/vox.12214.
189. Benjamin RJ, Wagner SJ. Bacterial pathogen reduction requires validation under conditions of intended use. *Transfusion*. 2015;55:2060–3. doi:10.1111/trf.13232.
190. Störmer M, Vollmer T. Diagnostic methods for platelet bacteria screening: current status and developments. *Transfus Med Hemother*. 2014;41:19–27. doi:10.1159/000357651.
191. Schrezenmeier H. Thrombozyten-Transfusionen: Aktuelle Aspekte und Kommentar zu Kapitel 2 „Thrombozytenkonzentrate“ der Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten der Bundesärztekammer 2008. *Hämotherapie*. 2010;14:16–23.
192. Kuehnert MJ. Platelet Transfusion Reaction Due to *Yersinia enterocolitica*. *JAMA*. 1997;278:550. doi:10.1001/jama.1997.03550070042035.
193. Mitchell R, Barr A. Transfusing *Yersinia enterocolitica*. *BMJ*. 1992;305:1095. doi:10.1136/bmj.305.6861.1095.
194. Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18:195–204. doi:10.1128/CMR.18.1.195-204.2005.
195. Ramirez-Arcos S, Mastronardi C, Perkins H, Kou Y, Turner T, Mastronardi E, et al. Evaluating the 4-hour and 30-minute rules: effects of room temperature exposure on red blood cell quality and bacterial growth. *Transfusion*. 2013;53:851–9. doi:10.1111/j.1537-2995.2012.03807.x.
196. Ramirez-Arcos S, Perkins H, Kou Y, Mastronardi C, Kumaran D, Taha M, et al. Bacterial growth in red blood cell units exposed to uncontrolled temperatures: challenging the 30-minute rule. *Vox Sanguinis*. 2013;105:100–7. doi:10.1111/vox.12027.
197. AuBuchon JP. The reliability of bacterial detection in platelets. *ISBT Science Series*. 2006;1:59–63.
198. Sazama K. Bacteria in blood for transfusion. A review. *Arch Pathol Lab Med*. 1994;118:350–65.
199. Robert Koch-Institut. Mindestanforderungen an die mikrobiologische Kontrolle von Blutkomponenten zur Transfusion. Aktualisierung des Votums 16. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2013;56:474–5. doi:10.1007/s00103-012-1647-4.
200. Walther-Wenke G, Daubener W, Heiden M, Hoch J, Hornei B, Volkens P, von König, Carl Heinz Wirsing. Effect of Safety Measures on Bacterial Contamination Rates of Blood Components in Germany. *Transfus Med Hemother*. 2011;38:231–5. doi:10.1159/000330417.
201. Neubauer H, Hensel A, Aleksic S, Meyer H. Identification of *Yersinia enterocolitica* within the Genus *Yersinia*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2000;23:58–62. doi:10.1016/S0723-2020(00)80046-6.
202. Stelzl M. Mikrobiologische Qualitätskontrolle von Trinkwasser: Vergleich einer Alternativmethode zur Bestimmung von *Escherichia coli* und Coliformen mit der herkömmlichen Untersuchungstechnik. Wien; 2010.
203. Jacor H-K. R. Firstenberg-Eden and G. Eden, Impedance Microbiology. XIII + 170 S., 73 Abb., 5 Tab. New York-Brisbane-Chichester-Toronto-Singapore 1984. John Wiley and Sons Inc. Letchworth/ England 1984. Research Studies Press Ltd. £ 24.50. ISBN: 0-86380-020-3 (Research Studies Press), 0-471-90623-9 (John Wiley and Sons). *J Basic Microbiol*. 1986;26:48. doi:10.1002/jobm.3620260116.
-

-
204. Sylab. BacTrac 4300 Microbiological Multi Monitoring System. <http://microbiology.sylab.com/products/p/show/Product/product/bactrac-4300.html>. Accessed 2 Dec 2016.
205. Merck Millipore. Sterility Testing Media and Rinse Fluids. http://www.merckmillipore.com/DE/de/products/industrial-microbiology/sterility-testing/culture-media-and-rinsing-fluids/i8ab.qB.7UQAAAE_WAR3.Lxj.nav. Accessed 2 Dec 2016.
206. Schütz M, Weiss E-M, Schindler M, Hallstrom T, Zipfel PF, Linke D, Autenrieth IB. Trimer stability of YadA is critical for virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity*. 2010;78:2677–90. doi:10.1128/IAI.01350-09.
207. Skurnik M, Bölin i, Heikkinen H, Piha S, Wolf-Watz H. Virulence Plasmid-Associated Autoagglutination in *Yersinia* spp. *J. Bacteriol.* 1984;158:1033–6.
208. Hank C. Ein Beitrag zum Vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in Hackfleisch und Fleischerzeugnissen vom Schwein im Hinblick auf die eingesetzten Kultur- und Isolierungsverfahren. München; 2003.
209. Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 41 / 2006.
210. Hammerl JA, Klein I, Lanka E, Appel B, Hertwig S. Genetic and functional properties of the self-transmissible *Yersinia enterocolitica* plasmid pYE854, which mobilizes the virulence plasmid pYV. *J Bacteriol.* 2008;190:991–1010. doi:10.1128/JB.01467-07.
211. Kraushaar B, Dieckmann R, Wittwer M, Knabner D, Konietzny A, Made D, Strauch E. Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain harbouring an ail gene. *J Appl Microbiol.* 2011;111:997–1005. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05112.x.
212. Cervia JS, Wenz B, Ortolano GA. Leukocyte Reduction's Role in the Attenuation of Infection Risks among Transfusion Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45:1008–13. doi:10.1086/521896.
213. Böhme K, Steinmann R, Kortmann J, Seekircher S, Heroven AK, Berger E, et al. Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002518. doi:10.1371/journal.ppat.1002518.
214. Boland A, Cornelis GR. Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells: Interaction of *Yersinia* with Host Cells. In: Oelschlaeger, Tobias A.; Hacker, Jörg. p. 343–382.
215. Australian Red Cross Blood Service. [transfusion.com.au](http://www.transfusion.com.au/transfusion_practice/administration). http://www.transfusion.com.au/transfusion_practice/administration. Accessed 23 Nov 2016.
216. Siblino L, Lafeuillade AR, Garraud O, Pozzetto B. Influence of blood prestorage conditions and white blood cell filtration on the bacterial load of blood deliberately inoculated with Gram-positive and Gram-negative pathogens. *Vox Sanguinis*. 2004;87:241–9.
217. Sheppard SV. Mechanisms and Technical Aspects of Leukocyte Depletion. In: Matheis G, Moritz, A, Scholz, M, editors. *Leukocyte Depletion in Cardiac Surgery and Cardiology*. Basel: S. Karger; 2002. S.16-32.
218. Robert Koch-Institut (RKI). *SurvStat@RKI 2.0*, Abfragedatum: 31.05.2016. <https://survstat.rki.de/>.
219. Bünte H, Bünte K. *Das Spektrum der Medizin: Illustriertes Handbuch von den Grundlagen bis zur Klinik*. Stuttgart u.a.: Schattauer; 2004.
220. Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, et al. Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1002355. doi:10.1371/journal.ppat.1002355.
221. Wagner SJ, Friedman LI, Dodd RY. Transfusion-Associated Bacterial Sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994;7:290–302.
222. Deutsches Rotes Kreuz. *Blutgruppen & Verteilung in der Bevölkerung – Über die Blutspende beim DRK*. <https://www.drk-blutspende.de/spenderservices/blutgruppen-und-verteilung-in-der-bevoelkerung.php>. Accessed 24 Nov 2016.
223. Hagel Sea. *Neue S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple*.
224. Schmidt RF, Lang F, Thews† G. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*. 29th ed. Berlin Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2005.
-

- 225.Bothe F. Untersuchung zum Vorkommen von *Yersinia-enterocolitica*-Infektionen während der Ferrelaufzuchtphase; 2015.
- 226.Kasimir S. Verlaufsuntersuchungen zum Vorkommen potentiell humanpathogener *Yersinia enterocolitica* und *Campylobacter* spp. in Schweinebeständen von der Geburt bis zur Schlachtung sowie Genotypisierung ausgewählter Isolate. Leipzig; 2005.
- 227.Heesemann J. Der Kampf gegen Infektionskrankheiten: Eine Sisyphus-Arbeit?; 2006.
- 228.Störmer M, Arroyo A, Brachert J, Carrero H, Devine D, Epstein JS, et al. Establishment of the first international repository for transfusion-relevant bacteria reference strains: ISBT working party transfusion-transmitted infectious diseases (WP-TTID), subgroup on bacteria. *Vox Sanguinis*. 2012;102:22–31. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01510.x.
- 229.Heesemann J. Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden. *Immun. Infekt.* 1990;18, 6, 186-91.
- 230.Heesenmann J, Eggers C, Schröder J. Serological diagnosis of yersiniosis by immunoblot technique using virulence-associated antigen of enteropathogenic *Yersiniae*. In: Prpic JK, DAVEY RB (Hrsg.). *The Genus Yersinia: Epidemiology, Molecular Biology and Pathogenesis*. Verlag Karger, Basel, S. 285-9.
- 231.Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, Chou M, Seghatchian J, Burnouf T, Boulanger C, Garraud O, Amabile N. The role of microparticles in inflammation and transfusion: A concise review. *Transfusion and Apheresis Science* 2015;53, 2: 159-67.
- 232.Koch I, Dach K, Heesemann J, Hoffmann R. *Yersinia enterocolitica* inactivates NK cells. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303, 08:433-42.
- 233.Roggenkamp A, Ruckdeschel K, Leitritz L, Schmitt R, Heesemann J. Deletion of Amino Acids 29 to 81 in Adhesion Protein YadA of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:8 Results in Selective Abrogation of Adherence to Neutrophils. *Infect. Immun.* 1996;64, 7:2506-2514.