

**Aus der Tropenmedizinischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik
akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg**

Leiter : Priv.-Doz. Dr. med. A.Stich

**Blutgruppenbestimmung unter einfachen
Bedingungen – Konservierung von ABO –
Testsubstanzen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christiane Bittner

aus Würzburg

Würzburg, März 2007

Referent: Prof. Dr. med. Klaus Fleischer

Koreferent: Prof. Dr. med. Markus Böck

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

25.01.2008

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern

GLIEDERUNG

Liste der Abkürzungen

I.	EINLEITUNG	1
II.	GRUNDLAGEN	
1.	Allgemeines über Blutgruppenbestimmung	7
2.	Testseren und Testerythrozyten zur Bestimmung der ABO-Blutgruppen	10
2.1.	Testseren	10
	Allgemeine Anforderungen	10
	Konservierungssubstanzen	12
2.2.	Testerythrozyten	14
	Allgemeine Anforderungen	14
	Konservierungssubstanzen	14

MATERIAL UND METHODE

III. HERSTELLUNG DER TESTSUBSTANZEN

1.	Herstellung von ABO-Testseren	16
----	-------------------------------	----

1.1. Material	16
1.2. Verarbeitung	16
Gewinnung	16
Aufarbeitung	18
Konservierung mit Natriumazid	18
2. Herstellung von ABO-Testerythrozyten	19
2.1. Material	19
2.2. Verarbeitung	19
Gewinnung	19
Aufarbeitung und Konservierung mit Natriumcitrat und Formalin	20
Aufschwemmung	20
IV. VERWENDETE METHODE ZUR QUALITÄTSBESTIMMUNG DER TESTSUBSTANZEN	
1. Titerbestimmung der Seren	21
2. Agglutinationsverhalten der Erythrozyten	24
3. Blutgruppenbestimmung auf der Tüpfelplatte	25

V.	UNTERSUCHUNGEN	
1.	Testseren	28
1.1.	Titermessungen in Abhängigkeit von Dauer und Temperatur der Lagerung	28
1.2.	Poolen der Testseren	29
1.3.	Sterilitätsprüfung der Testseren	31
1.4.	Belastbarkeitsprüfung durch verschärfte Kontamination der Testseren mit vier repräsentativen ubiquitären Keimen	33
2.	Testerythrozyten	37
2.1.	Agglutinationsverhalten von Testerythrozyten in Abhängigkeit von Dauer, Temperatur und Blutgruppe	37
2.	Genauigkeitskontrolle der Testsubstanzen (Anti-A, Anti-B, Anti-AB, A, B und O) zur Blutgruppenbestimmung	39
VI.	VERWENDETE STATISTISCHE METHODEN	41

VII. ERGEBNISSE

1. Testserien	44
1.1. Titermessungen in Abhängigkeit von Dauer und Temperatur der Lagerung	44
Abhängigkeit des Titerabfalls von der Dauer der Lagerung	44
Lagerung bei +4°C	44
Werte nach 4 Wochen	44
Werte nach 8 Wochen	45
Werte nach 14 Wochen	45
Werte nach 8 und 14 Wochen	46
Lagerung bei +25°C	46
Werte nach 4 Wochen	46
Werte nach 8 Wochen	47
Werte nach 14 Wochen	47
Werte nach 8 und 14 Wochen	48
Lagerung bei +37°C	48
Werte nach 4 Wochen	48
Werte nach 8 Wochen	49
Werte nach 14 Wochen	49
Werte nach 8 und 14 Wochen	49
Abhängigkeit des Titerabfalls von der Temperatur der Lagerung	51
Lagerung über 4 Wochen	51
Lagerung über 8 Wochen	52
Lagerung über 14 Wochen	54

1.2. Poolen der Testseren	56
1.3. Sterilitätsprüfung der Testseren	57
1.4. Verschärfte Kontamination der Testseren mit vier verschiedenen Keimen	58
Vorversuch	58
Titermessung vor und nach Kontamination	60
Vergleichskurve ohne Kontamination	61
2. Testerythrozyten	62
2.1. Abhängigkeit des Agglutinationsverhaltens von der Dauer der Lagerung	62
Lagerung bei +4°C	62
Werte nach 15 Tagen	62
Werte nach 30 Tagen	62
Lagerung bei +25°C	63
Werte nach 15 Tagen	63
Werte nach 30 Tagen	63
2.2. Abhängigkeit des Agglutinationsverhaltens von der Temperatur der Lagerung	65
Lagerung über 15 Tage	65
Lagerung über 30 Tage	66

3.	Genauigkeitskontrolle der Testseren und Testerythrozyten (Anti-A, Anti-B, Anti-AB, A, B und O) zur Blutgruppenbestimmung	68
4.	Fehlerquellen	74
5.	Kosten	76
5.1.	Anschaffungskosten	76
5.2.	Laufende Kosten	76
6.	Einfachheit	78
7.	Zeitaufwand	78

VIII. DISKUSSION

1.	Herstellung von ABO-Blutgruppenbestimmungssets	80
2.	Tauglichkeit der Testsets im Hinblick auf Lagerung unter Tropischen Klimaverhältnissen	81
2.1.	Testseren	81
	Dauer der Lagerung	81
	Temperatur der Lagerung	82
2.2.	Testerythrozyten	83
3.	Belastbarkeit der Testseren mit Mikroorganismen	84

4. Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit handelsüblichen Präparaten	85
--------------------------------------------------------------------------	-----------

IX. ZUSAMMENFASSUNG	86
----------------------------	-----------

X. ANHANG

1. Anleitung zur Produktion und Verwendung von Blutgruppenbestimmungssets im Einsatz unter einfachen Bedingungen	88
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

2. Anmerkungen	92
-----------------------	-----------

XI. LITERATUR	95
----------------------	-----------

DANKSAGUNG

CURRICULUM VITAE

Liste der Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
h	Stunde
KBE/ml	Kolonienbildende Einheiten /ml
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
Rh	Rhesus
St	Stück
z.B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Bluttransfusionen stellen in der heutigen Medizin einen selbstverständlichen und nicht mehr wegzudenkenden Baustein in der Behandlung akuter und chronischer Anämien dar.

Bereits im Zweiten Weltkrieg wurde die lebensrettende Wirkung von Bluttransfusionen in großem Ausmaß offenkundig, als es galt akute Anämien, traumatischen Ursprungs zu bekämpfen.

Seither entwickelte sich das Transfusionswesen zu einer weltweit gängigen Praxis.

Auch heute ist die Behandlung schwerer Anämien ohne Transfusionen unmöglich.

Anämien werden im Wesentlichen in die folgenden vier ätiologischen Gruppen eingeteilt: Den Verlust von Erythrozyten, die ineffektive Erythropoese, den vermehrten Abbau von Erythrozyten und Verteilungsstörungen. Alle Gruppen können eine transfusionswürdige Form annehmen.

Anämien sind vor allem in nicht industrialisierten Ländern ein großes Problem. Ursächlich kommen hier vor allem Mangelernährung und damit eine verminderte Zufuhr an den für die Erythropoese wichtigen Faktoren Eisen, Vitamin B12 und Folsäure sowie chronischer Blutverlust durch Infektionskrankheiten wie Malaria, Hakenwurm oder Schistosomiasis in Betracht. (18)

Chronische Anämien werden in der Regel gut toleriert, so daß Bluttransfusionen nicht nötig sind, solange der Hämoglobinwert stabil in einem tolerablen Bereich bleibt. Wenn er aber zum Beispiel im Falle einer aplastischen oder einer hämolytischen Krise rasant sinkt und der Patient symptomatisch wird, ist eine Transfusion unumgänglich. Ebenso erfordern kombinierte Erkrankungen wie zum Beispiel schwere Anämie vergesellschaftet mit kardialer Insuffizienz Transfusionen. (16)

In Industrieländern bilden akute Anämien den größeren Einsatzbereich für Transfusionen. Schwere chronische Anämien, häufig verursacht durch

Krankheiten wie Malaria oder andere parasitäre Infektionen sind hingegen in den nicht industrialisierten Ländern häufigste Ursache.

Die größten Gruppen der Bluttransfusions-Empfänger in low income countries sind Kinder und Wöchnerinnen. Schwere Hämorrhagien auf dem Boden einer chronischen Anämie machen bei diesen Patienten Transfusionen unabdingbar.

Die Indikation zur Transfusion wird nach 25%igem Volumenverlust gestellt.

Abhängig vom Ausgangshämoglobinwert, sollte nach einem 25% Volumenverlust transfundiert werden.

Bei Kindern bis 6 Jahren gilt der Wert von 5g/dl kombiniert mit respiratorischer Insuffizienz oder anderen Hypoxiezeichen als Indikation für Transfusionen, respektive 4g/dl bei Infektbedingter Anämie ohne respiratorische Zeichen oder bei Hb unter 3g/dl ohne Infektzeichen oder Hypoxiezeichen.

Bei elektiven chirurgischen Eingriffen ist eine Transfusion indiziert, wenn ein Blutverlust von mehr als 500ml vermutet wird und der Ausgangswert unter 8g/dl liegt.

Wenn bei akuter Hämorrhagie mehr als 30% des Blutvolumens verloren gehen und mit kristalloiden Lösungen der Blutdruck und die Oxygenation nicht aufrechterhalten werden kann muss transfundiert werden. (15)

Akuter Blutverlust ist ein Hauptgrund der Mortalität von gebärfähigen Frauen in nicht industrialisierten Ländern.

In der Schwangerschaft sieht man von Bluttransfusionen ab, außer der Hämoglobinwert ist $\leq 6\text{g/dl}$. Unmittelbar präpartal und wenn zusätzlich cardio-respiratorische Einschränkungen vorliegen, gilt als Richtwert $\leq 7\text{g/dl}$. (25)

In vielen ländlichen Hospitälern nicht industrialisierter Länder bestehen jedoch logistische sowie finanzielle Engpässe um ein intaktes Transfusionswesen aufzubauen.

Die Entscheidung zur Transfusion muss gerade hier harten Kriterien folgen, welche folgende vier „key points“ benennen. (12)

1. Bluttransfusion kann lebensrettend sein, jedoch auch Leben gefährden.

Deshalb ist eine korrekte Anwendung notwendig.

2. Transfusion ist nur ein Element der Patientenbehandlung

3. Die Entscheidung zur Bluttransfusion sollte immer auf einer sorgfältigen Bestandsaufnahme von klinischen und laborchemischen Kriterien basieren.

4. Die internationalen Richtlinien für den klinischen Gebrauch von Blut, sowie der individuelle Nutzen des Patienten sind entscheidend.

Gerade in Ländern mit hoher Inzidenzrate von Hepatitiden, HIV und anderen Infektionskrankheiten, kombiniert mit mangelnder Labordiagnostik bzw nicht aufzeigbarer Antikörper während der „Window-Periode“, ist es entscheidend Transfusionen nur dann zu geben, wenn diese für das Überleben des Patienten notwendig sind.

Um die für Transfusionen notwendigen Blutgruppenbestimmungen durchführen zu können, benötigt man Testsubstanzen.

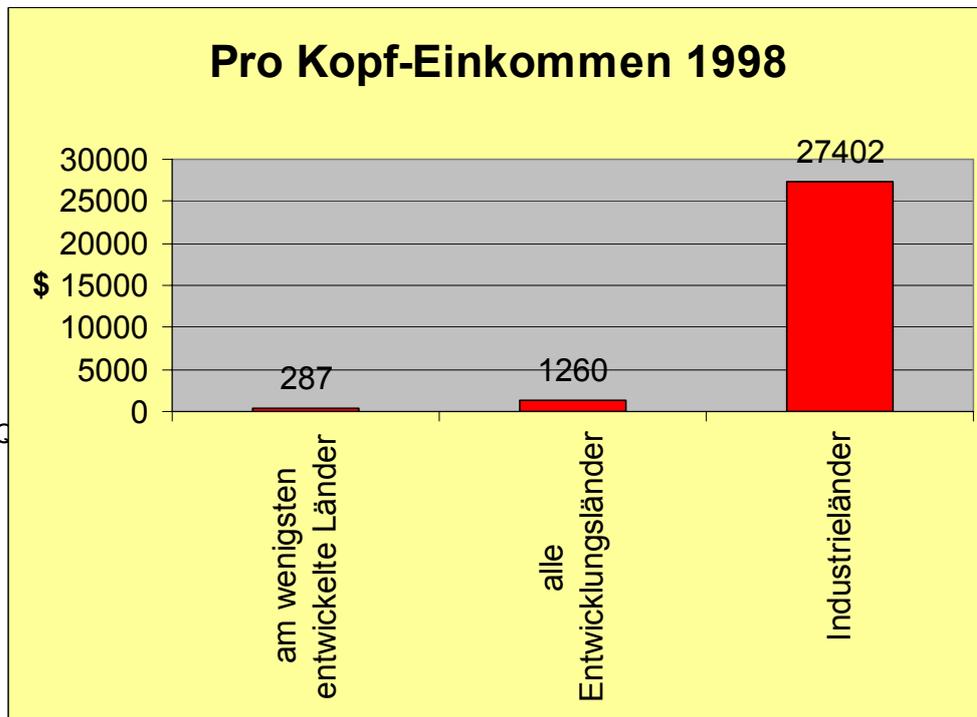
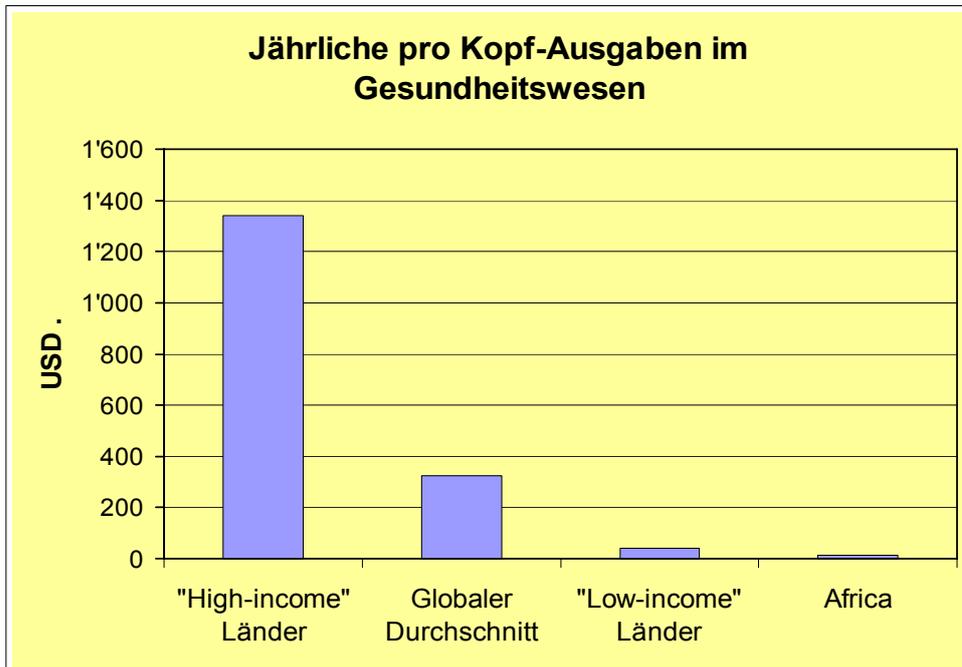
Die elementaren Bausteine hierbei sind Testseren und Testerythrozyten zur Ermittlung der ABO-Blutgruppen.

Hindernisreiche Anfahrtswege, meist ohne Möglichkeit der Kühlung, erschweren die Versorgung mit industriell hergestellten Testsubstanzen.

Wie in vielen Ländern bei Medikamenten üblich, sind auch Laborreagenzien häufig von minderer Qualität z.B. verdünnt. Die oft nicht vorhandenen Qualitätskontrollen machen den Vertrieb noch einfacher.

Die Kosten für eine Blutspende sind meist von den Patienten oder dessen Angehörigen voll zu tragen und oft ein Hindernisgrund medizinische Hilfe (sofern vorhanden) in Anspruch zu nehmen. Die Engpässe in finanzieller Hinsicht werden deutlich wenn man sowohl das Einkommen als auch das durchschnittliche Jahresbudget pro Patienten im Gesundheitswesen eines „low-income“-Landes mit dem eines „high-income“-Landes vergleicht.

Hierüber geben die folgenden Graphiken eindrücklich Auskunft.



Quelle: Better Healthin Afrika, World Bank 1994

Somit ergibt sich, daß die Herstellung von Testseren und Testerythrozyten vor Ort eine hilfreiche Option darstellt, Transfusionen in "low-income"-Ländern zu

gewährleisten.

Da viele ländliche Hospitäler in jenen Ländern technisch und personell minimal ausgestattet sind, benötigt man einfache und genaue Methoden mit geringem Kosten- und Zeitaufwand (2).

Aus diesen Ansprüchen formen sich vier Punkte als Ziel meiner Arbeit.

Es soll zum Einen getestet werden, ob die Möglichkeit besteht, zuverlässige ABO-Blutgruppen-Bestimmungs-Set's, das heißt ABO-Testseren und Testerythrozyten, unter einfachen Bedingungen herzustellen.

Zum Zweiten sollen diese Sets auf ihre Tauglichkeit zur Verwendung unter tropischen Klimaverhältnissen geprüft werden, wo eine hinreichende Kühlung nicht immer gewährleistet werden kann.

Zum Dritten soll unter diesem Aspekt geprüft werden ob derart hergestellte Testsubstanzen einer erhöhten mikrobiellen Belastung standhalten und dessen Titerstärke gewahrt bleibt.

Zum Vierten muss als Voraussetzung für solide Verwendbarkeit dieser Materialien abschließend verglichen werden, ob die gewonnenen Resultate mit denen handelsüblicher Präparate übereinstimmen.

II. GRUNDLAGEN

II.1. Blutgruppenbestimmung im Hinblick auf Transfusion

Um das Jahr 1900 beobachtete Karl Landsteiner das Phänomen der Iso-Hämagglutination. 1901 veröffentlichte er weitere Untersuchungsergebnisse, durch die eine Einteilung der Bevölkerung in die drei Blutgruppen A, B und O möglich wurde. Ein Jahr später entdeckten zwei Schüler Landsteiners eine vierte, weniger verbreitete Blutgruppe, AB. (3)

Das ABO-Blutgruppensystem bildet seither die Grundlage der Blutgruppenserologie und der Durchführung der Bluttransfusionen.

Seit jener Zeit wurden zahlreiche A-Untergruppen nominiert, von welchen jedoch die meisten nur von wissenschaftlichem Interesse sind, und in der Regel lediglich A₁ und A₂ transfusionsrelevant ausgetestet werden.

Es wurde eine Vielzahl anderer Blutgruppensysteme (z.B. MN-System, P-System) mit hauptsächlich forensischer, weniger jedoch transfusionsmedizinischer Bedeutung entdeckt.

Von großem Interesse ist neben der A₁/A₂-B-O-Bestimmung, das Vorhandensein der so genannten Rhesusfaktoren, einteilbar in die Hauptgruppen C, D und E.

Das Rhesus-Blutgruppensystem hat jedoch in verschiedenen Regionen eine unterschiedliche Relevanz, da in manchen Regionen nahezu nur Rh-positive Träger vorkommen.

Die folgende Tabelle gibt Auskunft über dessen Häufigkeit in exemplarischen Regionen (15)

Prozentuale Häufigkeit von Rhesus D positiv in verschiedenen Bevölkerungsgruppen

Region	Prozent der Bevölkerung
--------	-------------------------

	Rhesus D positiv	Tabelle 1 In „low-income“-Ländern, in welchen nur ein geringer Prozentsatz der Bevölkerung Rh negativ ist, muss eine routinemäßige Kontrolle des Rhesusfaktors oft aus Kostengründen abgewogen werden, sodass nur Frauen im gebärfähigen Alter und Gruppen welche häufige Transfusionen zu erwarten haben, getestet werden.(15)
Asien	90-98	
Afrika	94-95	
Nepal	99-100	
Orient	99-100	
Kaukasier	ca 85	

In Anbetracht der obigen Tatsache ist es selten Rhesusfaktor negative Empfänger zu haben aber ebenfalls schwierig Rhesusfaktor negative Spender zu finden. Wichtig ist es aber auch alle Mädchen im nicht gebärfähigen Alter zu testen da diese bei negativen Rh Faktor immunisiert werden würden.

Dennoch ist zu betonen, dass eine vollständige Blutgruppenbestimmung die Testung des Rhesusfaktors beinhaltet.

In meiner Arbeit soll jedoch die Herstellung dieser Rhesus-Testsubstanzen nicht weiter berücksichtigt werden, da die Ergebnisse vornehmlich in Afrika Anwendung finden werden.

Im Folgenden wird kurz auf die Grundlagen des ABO-System's eingegangen.

Die vier Blutgruppen sind durch Blutgruppenantigene charakterisiert, welche die roten Blutkörperchen besitzen. Je nach dem Vorhandensein oder Fehlen der Blutgruppenantigene A und B lässt sich die Blutgruppe eines Menschen als A, B, AB oder O bestimmen, wobei O das Fehlen von A und B bedeutet.

Ferner wurde nachgewiesen, daß es entsprechend der Blutgruppenantigene auch Antikörper Anti-A, Anti-B und Anti-AB gibt. Diese treten im Serum der Menschen auf, deren Erythrozyten das entsprechende Agglutino-gen fehlt. Es handelt sich um komplette Antikörper welche eine direkte Agglutination des auf dem entsprechenden Erythrozyten vorhandenen Antigen hervorruft. Alle Personen derselben Blutgruppe besitzen die gleiche Art von Agglutinogenen auf ihren Erythrozyten. Die

Agglutinationsfähigkeit derselben ist aber von Individuum zu Individuum verschieden, sodaß der Agglutinationstiter im Serum verschiedener Individuen der gleichen Blutgruppe beträchtlich schwankt. Der normale Anti-A und Anti-B Titer ist bei der Geburt sehr schwach und kann bis zum Alter von 3 Monaten kaum nachgewiesen werden, hat um das 20. Lebensjahr die höchsten Werte um anschließend wieder abzunehmen.

Die Entstehung dieser Antikörper, welche als „natürlich vorkommend“ bezeichnet werden, beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion, welche durch Antigene, die den AB-Antigenen sehr ähnlich sind, hervorgerufen werden. Diese Antigene findet man in Bakterien, Viren und zahlreichen Nahrungsmitteln.

Die prozentuale Häufigkeit der ABO Blutgruppen variiert in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Die nachfolgende Tabelle gibt hierüber Auskunft. (19)

Prozentuale Häufigkeit der ABO Blutgruppen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen

Gruppe	Kaukasier	Afrikaner	Orientalen
A	40	27	28
B	11	20	27
AB	4	4	5
0	45	49	40

Tabelle 2

A und B können weiterhin in Untergruppen A₁, A₂ und schwaches B klassifiziert

werden.

Ungefähr 80% der A-Population hat die Untergruppe A_1 , die verbleibenden 20% besitzen Untergruppe A_2 . Die gleiche prozentuale Verteilung betrifft den A-Anteil der Gruppe AB. A_1 besitzt nur Anti-B, es ist jedoch möglich, dass Menschen mit der Subgruppe A_2 und A_2B Anti- A_1 im Serum zu haben. Doch dies ist gewöhnlich schwach und transfusionsmedizinisch nicht von Bedeutung.

Die schwache Form von B ist selten, kann aber in der chinesischen Population gefunden werden. (19)

Die Blutgruppe eines Menschen lässt sich mit Hilfe der Agglutinationsreaktion bestimmen. Hierfür werden einmal die Erythrozyten des Individuums mit Anti-A und Anti-B und Anti-AB Testseren, ferner sein Serum mit Testerythrozyten der Gruppen A, B und 0 angesetzt.

Zu einer zuverlässigen Bestimmung gehört die Ausführung beider Verfahren, die sich gegenseitig kontrollieren sowie eine Auto-Kontrolle, in welcher die Patienten - respektive Spender - eigenen Erythrozyten mit dem eigenen Serum getestet werden. (3,13).

II.2. Testseren und Testerythrozyten zur Bestimmung der ABO-

Blutgrupp

II.2.1. Testseren

Testseren können aus verschiedenen Substanzen hergestellt werden: Zum einen aus menschlichem Serum, zum anderen aus Pflanzen- und Tiermaterialien. So kann zum Beispiel der Samen von *Dolichos biflorus* zur Herstellung von Anti-A1genutzt werden. Anti-A von der Albumin-Drüse der Schlangen *Helix pomatia* und *Helix aspera* ist ein Beispiel für ein Reagenz aus tierischem Rohstoff. (18)

Im Weiteren soll nur auf die Herstellung von Reagenzien aus menschlichem Serum eingegangen werden. Anti-A, Anti-B und Anti-AB kann von Spendern mit „natürlich“ hohem Titer oder von künstlich immunisierten Personen gewonnen werden.

Letzteres kommt aufgrund der Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion für Länder mit niedriger notfallmedizinischer Ausrüstung nur bedingt in Betracht.

Allgemeine Anforderungen

Testseren (Anti-A, Anti-B, Anti-AB) müssen folgende Mindestanforderungen erfüllen: (4,6)

- Klarheit und Farbneutralität

Klarheit und Farbneutralität ist gewährleistet, wenn keine Verfärbung durch pathologische Blutfarbstoffe (z.B. Bilirubin, Methämoglobin), keine Trübung (z.B. durch Lipämie) und keine Hämolyse vorliegt.

- Hohe Aktivität

Hohe Aktivität ist gegeben wenn eine rasche und starke Reaktion (nach mindestens fünf Minuten) auch mit schwachen Antigenen eintritt.

- Ausreichender Titer:

Ein ausreichender Titer liegt vor bei folgenden Werten:

0-Serum	Anti-B	1:32
	Anti-A1	1:64
	(Anti-A2	1:16)
A-Serum	Anti-B	1:64
B-Serum	Anti-A1	1:64
	(Anti-A2	1:16)

Tabelle 3

- Spezifität

Spezifität liegt vor bei Abwesenheit von anderen irregulären spezifischen Antikörpern, Kälteagglutininen, pseudoagglutinierenden Faktoren und weiteren die Reaktion oder Ablesung beeinträchtigenden Eigenschaften.

- Sterilität

Sterilität ist zu erreichen durch Zugabe eines die Reaktion nicht beeinträchtigenden Konservierungsmittels zur Vermeidung einer späteren mikrobiellen Kontamination.

Bedeutung der Sterilität - Die bakterielle Panagglutination

Gewisse Bakterien und Viren haben die Fähigkeit sowohl Erythrozyten als auch Seren so zu verändern, daß sie panagglutinieren.

Derart kontaminierte Seren bergen die Gefahr einer falscher Blutgruppenbestimmung.

Panagglutinierende Seren

Davidsohn und Toharsky zeigten, daß ein Serum nach Verunreinigung mit einem Stamm Corynebakterien, welchen sie "H" nannten, alle Proben menschlicher Blutkörperchen agglutinierte. Diese Agglutination wurde durch den Organismus

verursacht, der im Serum die Bildung von Anti-"H"-Agglutininen bewirkte, während die Erythrozyten das entsprechende Agglutinogen "H" tragen (9).

Panagglutinable Erythrozyten

Entsprechend vermögen gewisse Bakterien Erythrozyten in vitro zu modifizieren, indem sie die Expression von Antigenen bewirken, für die in normalen menschlichen Seren ein entsprechender Antikörper vorhanden ist. Dies ist die Grundlage der "T"-Agglutination. Ein latenter Rezeptor "T" an den menschlichen Erythrozyten wirkt wie ein Agglutinogen, wenn er dem Einfluss gewisser Bakterien, z.B. Clostridium welchii oder Vibrio cholerae ausgesetzt wird. Ein entsprechender Antikörper, Anti-T, ist in allen menschlichen Seren - mit Ausnahme der Seren von Neugeborenen - vorhanden, so dass Blutkörperchen, die durch Bakterien modifiziert worden sind von allen Seren agglutiniert werden, also panagglutinabel sind (9).

Zudem kann Kontamination einen Titerabfall bewirken, falls die Mikroorganismen Proteasen enthalten (11).

Konservierung

Als antimikrobieller Zusatz wird bei den gängigen, handelsüblichen Testseren **Natriumazid (NaN₃)** verwendet. Es handelt sich um ein kristallines, wasserlösliches Pulver, mit einer Löslichkeit von 40% bei 17°C. Da es mit Schwermetallen wasserunlösliche, inaktive, häufig explosive Verbindungen eingeht, kann man wasserlösliche Stoffe, wie z.B. Polyoxycarbonsäure oder deren Salze, die mit den Schwermetallen Komplexe bilden, zusetzen (5)

Mikrostatistische Wirkung von Natriumazid

Testorganismen	Minimale Hemmkonzentration in µg/ml unter 72h Inkubation bei 37° C
Staphylococcus aureus	10
Bacillus subtilis	16

Pseudomonas aeruginosum	32
Candida albicans	14
Aspergillus niger	32
Penicillium notatum	32

Tabelle 4 (5)

Natriumazid ist ein starkes Protoplasma Gift mit einem MAK-Wert von $0,2\text{mg/m}^3$. Die akute orale Toxizität bei der Ratte (LD_{100}) beträgt 40 - 60 mg/kg (5). Zur Konservierung von menschlichem Serum wird es in einer Konzentration von 0,1% im Verhältnis 1 ml Serum/10 μl Lösung verwendet.

Weitere detaillierte Angaben zu Eigenschaften, Darstellung, Anwendung sowie Warnhinweise zu Natriumazid befinden sich im Anhang.

Außerdem kommt als Konservierungsstoff noch Merthiolat (2-[(Ethylmercurio)-thio]-benzoesäure) - Natriumsalz in Betracht. Dieser sehr wirksame quecksilberhaltige Wirkstoff ist jedoch auf Grund der Toxizität des Schwermetalls in Verruf geraten, so daß die Anwendung Einschränkung findet und im Weiteren nicht darauf eingegangen werden soll.

II.2.2. Testerythrozyten

Allgemeine Anforderungen

Zur Kontrolle der Testseren werden Testblutkörperchen der Blutgruppen A₁, A₂, B und O verwendet. Mit ihrer Hilfe werden die Serumeigenschaften Anti-A und Anti-B bestimmt.

Testerythrozyten müssen eine optimale Agglutinabilität aufweisen, um auch schwach

reagierende Antikörper zu erfassen. Die Agglutinabilität ist bei Geburt gering, nimmt bis zum 20. Lebensjahr zu und verringert sich dann sehr langsam (6). Zudem müssen Testerythrozyten hoch spezifisch sein und keine weiteren Antigen-Eigenschaften aufweisen. Die Bedeutung der bakteriell bedingten Antigen-Eigenschaften wurde im Zuge des Kapitels II.2.1. besprochen.

Konservierung und Stabilisierung

Den handelsüblichen Testerythrozyten wird zur Stabilisierung CPD (Citrat-Phosphat-Dextrose) zugesetzt, um der vorzeitigen Alterung der Erythrozyten entgegenzuwirken.

Außerdem enthalten sie EDTA (Di-Natrium-Salz) um die Hämolyse zu unterbinden, die auftreten kann, wenn frisches Serum mit Immun-Anti-A und/oder -Anti-B und Komplement den Erythrozyten zugefügt wird.

Chloramphenicol (1:3000), Neomycinsulfat (1:10'000) und Gentamycin (1:20'000) werden als Konservierungsmittel zugesetzt (8).

Unter obengenannter Präparation sind die Testerythrozyten mindestens 4 Wochen haltbar. (8)

Eine weniger stabilisierende als konservierende und gerinnungshemmende Lösung ist die **Natriumcitratlösung mit Formolzusatz**.

Hierbei wird eine 3,8%-ige Natriumcitratlösung im Verhältnis 1:5 dem Vollblut hinzugefügt. Danach wird 1:100 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünntes Formalin dem Zitratblut im Verhältnis 1:7 zugesetzt.

Das Blut ist dann mindestens 4 Wochen haltbar.

Als Blutkuchen im eigenen Serum können die Testerythrozyten, bei +4⁰C gelagert, bis zu 6 Tage verwendet werden.

MATERIAL UND METHODE

III. HERSTELLUNG DER TESTSUBSTANZEN

III.1. Herstellung von ABO-Testseren

III.1.1 Material

- menschliches Vollblut der Blutgruppen A, B und O
- Natriumazid, reinst (kristallines Pulver)
- physiologische Kochsalzlösung
- 10 ml - Monovette, bzw. Spritze und Kanüle
- Zentrifuge (elektrisch oder handbetrieben) ca. 1000 U/min
- sterile, verschließbare Glasbehälter (ca. 5 ml)
- saubere Glasbehälter (zum Ansetzen der Konservierungslösung)
- Pipetten zum abpipettieren des Serums à 1 ml und à 10 µl
- Aqua destillata
- Waage (Genauigkeit mindestens 10 g)

III.1.2 Verarbeitung

Gewinnung

Als Testserumspender sind junge gesunde Personen aufgrund ihrer hohen Agglutinabilität besonders geeignet.

Zur Ermittlung benötigt man einmalig das Vorhandensein eines ABO-Blutgruppen-Bestimmungssets. Hat man von jeder Blutgruppe ca. drei Spender ermittelt, so besteht die Möglichkeit Blutgruppen-gleiche Seren zu mischen. Diesen Vorgang nennt man Poolen. Hierdurch wird weitgehend die Gefahr eingedämmt, ein schlecht

agglutinierendes Serum zu verwenden, da die Wahrscheinlichkeit, daß alle drei Serumspender niedrige Titer aufweisen, gering ist.

Zweckmäßig ist es, über diese Spender eine Kartei zu führen und sie so auszuwählen, daß sie ständig zur Verfügung stehen. Hierfür eignet sich z.B. sehr gut Krankenhauspersonal oder bekannte Dauerspender. Die Entnahme des Blutes erfolgt durch sterile Venenpunktion mit möglichst dicker Kanüle in eine 10 ml - Spritze (6).

Aufarbeitung

Um eine möglichst große Serumausbeute zu erlangen, lässt man das Blut in einem steril verschlossenen Gefäß mehrere Stunden stehen.

Stehen Kühlmöglichkeiten zur Verfügung, so wird zur Entfernung irregulärer Kälteagglutinine anschließend 12 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert. Bei dieser Temperatur werden Kälteagglutinine, die bei der Untersuchung störend in Erscheinung treten könnten, an die eigenen Blutkörperchen gebunden.

Wird das Blut zwei Minuten mit 1000 U/min zentrifugiert, so lässt sich nachfolgend der Serumüberstand vorsichtig mit einer 1ml-Pipette in den steril verschließbaren Glasbehälter abpipettieren.

Die Inaktivierung des Serums (Zerstörung des Komplements) kann durch 3 Minuten Lagerung im $+60^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad erfolgen (6).

Konservierung

Zur Konservierung wird Natriumazid in 0,1% Konzentration verwendet.

Zunächst stellt man eine 10% Stammlösung her.

10 g NaN_3 werden mit 90ml destilliertem Wasser in einem sauberen Gefäß bis zur Auflösung der NaN_3 -Kristalle vermischt.

Anschließend werden zu je 1 ml (1000 μl) Serum 10 μl 10% - ige NaN_3 - Lösung zugefügt und vorsichtig vermischt.

Das Testserum wird in sterile, verschließbare Gläschen (5 ml) gefüllt und gelagert.

III.2. Herstellung von ABO-Testerythrozyten

III.2.1. Material

- menschliches Vollblut der Blutgruppe A, B und O
- physiologische Kochsalzlösung
- Aqua destillata
- Natriumcitrat
- Formalin
- 10 ml-Monovette o.ä.
- sterile, verschließbare Glasbehälter (ca. 5 ml)
- Pipetten à 1 ml und à 10 µl
- Waage (Genauigkeit mindestens 0,1 g)

III.2.2. Verarbeitung

Gewinnung

Wie bei der Ermittlung der Testserumspender, so benötigt man auch für die Blutgruppenbestimmung der Testerythrozytenspender einmalig ein ABO-Blutgruppen-Bestimmungsset.

Um eine optimale Agglutinabilität zu erhalten sind ebenfalls Personen um das 20. Lebensjahr am geeignetsten.

Bei der Testserum-Gewinnung erfolgt die Entnahme des Blutes durch sterile Venenpunktion mit möglichst dicker Kanüle in eine 10ml-Spritze.

Aufarbeitung und Konservierung

Zur Aufbewahrung werden die Erythrozyten nicht von ihrem Serum getrennt. Das Vollblut wird mit einer 3,8% Natriumcitratlösung mit 1% Formalinzusatz konserviert.

Zur Herstellung einer 3,8% Natriumcitratlösung fügt man 3,8 g Natriumcitratpulver 96,2 g physiologische Kochsalzlösung zu.

Um 1% Formalin zu erhalten verdünnt man 3,3ml Formalin (37% Formaldehyd) mit 95,7 ml physiologischer Kochsalzlösung.

Dem Vollblut wird 3,8% Natriumcitratlösung im Verhältnis 1:5 zugefügt, zweckmäßigerweise 2 ml Vollblut zu 0,4 ml Natriumcitratlösung.

Danach wird das Citratblut im Verhältnis 7:1 mit dem 1% Formalin versehen (d.h. 2,4 ml Citratblut zu 0,343 ml 1% Formalin).

In sterilen verschließbaren Gläschen (ca. 5 ml) wird das verarbeitete Blut gelagert.

Aufschwemmung

Um die Testerythrozyten bei der Objektträgermethode verwenden zu können, ist es nötig eine 4% Aufschwemmung herzustellen (6).

Zunächst wird das konservierte Blut zweimal in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen.

Dazu vermischt man vorsichtig 1ml Blut mit 9ml physiologischer Kochsalzlösung und zentrifugiert es. Der Überstand wird abgegossen und der Vorgang noch einmal wiederholt.

Der Errechnung der Aufschwemmungsprozentzahlen liegt stets Vollblut zugrunde.

Um 5 ml einer 4% Suspension zu erhalten wird dem gewaschenen Erythrozytensediment 0,1 ml entnommen, mit 4,9 ml physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und vorsichtig gemischt.

Die Aufschwemmung ist nur am Tage der Herstellung verwendbar.

IV. VERWENDETE METHODEN ZUR QUALITÄTSBESTIMMUNG DER TESTSUBSTANZEN

IV.1. Titerbestimmung der Seren

Um die Qualität der ABO-Testseren, d.h. die Höhe der Antikörper ausdrücken zu können, wurde eine Vielzahl von Titerbestimmungen durchgeführt. Je höher der Antikörper-Titer eines Serums, desto höher ist bei standardisiertem Antigen die Anzahl der Antikörper.

Eine geometrische Verdünnungsreihe wurde vorbereitet.

Als technisches Mittel wurde die „Röhrchenmethode“ gewählt. (6)

Hierbei bringt man Antikörper und Antigen in Glasröhrchen zur Reaktion.

Material:

- Glasröhrchen
- Gestell für Glasröhrchen
- Pipette mindestens 0,2ml
- physiologische Kochsalzlösung
- standardisierte Testerythrozyten
- Zentrifuge
- Testserum

Bei Anwesenheit **eines** Antikörpers, das heißt bei Anti-A - oder Anti-B-Serum wird wie folgt vorgegangen.

1. Für die Verdünnungsreihe werden 10 Röhrchen aufgestellt
2. Man arbeitet von links nach rechts und füllt in die beiden ersten Röhrchen 0,2 ml des zu prüfenden Serums.
3. In das 2. - 10. Röhrchen füllt man je 0,2 ml physiologische NaCl Lösung

4. Es werden Serum und NaCl im 2. Röhrchen gut vermischt und 0,2 ml davon in das 3. Röhrchen pipettiert.
5. Der Vorgang wird bei jedem weiteren Röhrchen der Reihe wiederholt. Aus dem 10. Röhrchen werden 0,2 ml entfernt. Jedes Röhrchen enthält nun 0,2 ml Serum in steigender Verdünnung von 1:1 bis 1:512.
6. In jedes Röhrchen der Reihe werden 0,2ml der 3%-igen Test-Blutkörperchen-Aufschwemmung gegeben. Die Verdünnung des 1. Röhrchens beträgt jetzt 1:2, des 2.Röhrchens 1:4, des 3. Röhrchens 1:8, usw..
7. Anschließend gut schütteln, 10 Minuten stehen lassen und danach vier Minuten bei 1000 U/min zentrifugieren.
8. Das Ablesen erfolgt makroskopisch von rechts nach links durch leichtes Aufschütteln oder Beklopfen der Röhrchen. Der Titer des Serums, das heißt die Antikörpermenge ist reziprok dem Serumverdünnungsfaktor, bei dem gerade noch eine Reaktion eintritt.

Das bedeutet, daß ein Serum, das noch im Röhrchen mit der Verdünnung 1:64 eine Reaktion ergibt, einen Titer von 1:64 hat.

Bei Anwesenheit **mehrerer** Antikörper wird folgendermaßen vorgegangen:

1. Man benötigt zwei Verdünnungsreihen
2. Für jede Verdünnungsreihe werden jeweils 10 Röhrchen aufgestellt.
3. Man arbeitet von links nach rechts und füllt in das 1. Röhrchen jeder Reihe 0,2 ml und in das 2. Röhrchen der 1. Reihe 0,4 ml des zu prüfenden unverdünnten Serums.
4. In das 2. und jedes folgende Röhrchen der 1. Reihe füllt man 0,4 ml NaCl.
5. Serum und NaCl im 2. Röhrchen der 1.Reihe werden gut vermischt, 0,2ml in das 2. Röhrchen der 2. Reihe und 0,4ml in das 3. Röhrchen der 1. Reihe gefüllt.
6. Der Vorgang wird bei jedem Röhrchen wiederholt, und die letzten 0.4ml

werden verworfen. Die Röhrchen jeder Reihe enthalten 0,2ml Serum in steigender Verdünnung von 1:1 bis 1:512.

7. Jedem Röhrchen werden 0,2ml der entsprechenden 3%-igen Test-Blutkörperchen-Aufschwemmung zugesetzt. Beim O-Serum werden in der:
1. Reihe die A-Blutkörperchen, in der 2. Reihe die B-Blutkörperchen getestet.
8. Anschließend gut schütteln, 10 Minuten stehen lassen und danach vier Minuten bei 1000 U/min zentrifugieren.
9. Das Ablesen erfolgt makroskopisch von rechts nach links durch leichtes Aufschütteln oder Beklopfen der Röhrchen. Der Titer des Serums, das heißt die Antikörpermenge ist reziprok dem Serumverdünnungsfaktor, bei dem gerade noch eine Reaktion eintritt.

Als Erythrozytenaufschwemmung wurde standardisiert eine 3% Humanerythrozyten-Suspension der Firma "Ortho Diagnostic Systems" verwendet.

An Arbeitsbedingungen wurde Folgendes beachtet:

- Raumtemperatur von +25⁰C
- Helle elektrische Beleuchtung
- Bewertung der Titerstufen stets durch dieselbe Person.
- Eine Reaktion wurde als positiv bezeichnet, wenn ca. 1 - 10 Klümpchen in leicht homogen getrüberter Aufschwemmungsflüssigkeit vorlagen.

IV.2. Agglutinationsverhalten der Erythrozyten

Um die Qualität der ABO-Testerythrocyten, bzw deren Agglutinabilität, beurteilen zu können, wurden sie mit standardisierten ABO-Testseren getestet.

Es wurden handelsübliche Testseren verwendet, die einen Titer von 1:128 aufweisen, wenn sie mit ebenfalls handelsüblichen Testerythrozyten in Reaktion gebracht werden.

Die Prüfung erfolgte auf einer Porzellantüpfelplatte.

Material:

- Porzellantüpfelplatte
- standardisierte Testseren
- Glasstäbchen zum Verrühren der Reaktionsgemische
- Testerythrozyten

Die Stärke der Agglutination wurde in Stufen 0-4 eingeteilt (13):

Stufe 0 negativ, homogene Aufschwemmung ohne Agglutination.

Stufe 1 noch makroskopisch erkennbare kleine, zarte Klümpchen in einer Aufschwemmung.
Unter dem Mikroskop Klümpchen mit mehr als 20 Zellen

Stufe 2 ca. 2 - 10 Klümpchen in leicht homogen getriebener Aufschwemmungsflüssigkeit.

Auf dem Glasträger mit blosem Auge gerade noch sichtbar.

Stufe 3 ein Agglutinat in klarer Aufschwemmungsflüssigkeit, das aber bei leichtem Umrühren zerfällt

Stufe 4 ein einziges Agglutinat in klarer Aufschwemmungsflüssigkeit.

IV.3. Blutgruppenbestimmung auf der Tüpfelplatte

Die der ABO-Blutgruppen-Bestimmung auf der Tüpfelplatte wird folgendermaßen durchgeführt (6):

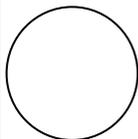
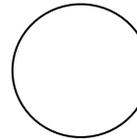
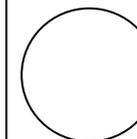
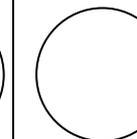
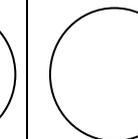
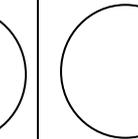
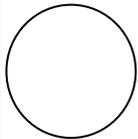
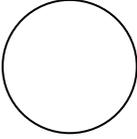
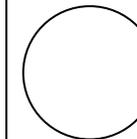
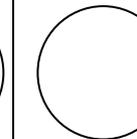
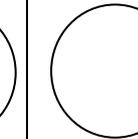
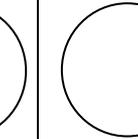
Material:

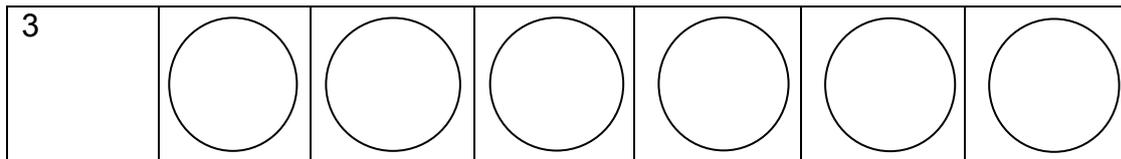
- Zu untersuchende Erythrozyten (2 mal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, 3% in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt)
- Zu untersuchendes Serum
- Testserum Anti-B, Anti-A, Anti-A und Anti-B
- Testblutkörperchen A, B, O

- Porzellantüpfelplatte
- Glasstäbchen zum Verrühren des Reaktionsgemisches
- Tropfpipette
- NaCl

Ausführung:

1. Beschriftung der Tüpfelplatte

	Testseren			Testerythrozyten		
	Anti – A	Anti – B	Anti – AB	A	B	O
1						
2						



2. Prüfung der Erythrozyteneigenschaften:

1. Ein Tropfen des entsprechenden Testserums wird in jede der drei Vertiefungen auf die linke Plattenseite getropft. Dabei muss der Tropfen von der Pipette fallengelassen werden, da jede Berührung der Pipette mit einem un-
2. Zu jedem Tropfen wird ein Tropfen der zu untersuchenden Erythrozytenaufschwemmung gegeben.
3. Erythrozyten und Serum werden mit einem Glasspatel gut vermischt. Das Glasstäbchen muss, bevor es in ein neues Reaktionsgemisch gebracht wird, mit NaCl gereinigt und abgewischt werden.
4. Nachdem die Platte 15 - 20 min bei Raumtemperatur (+25⁰C) lagerte, wird sie leicht rotierend bewegt, das Ergebnis abgelesen und notiert.

3. Prüfung der Serumeigenschaften:

1. In jede der drei Vertiefungen der rechten Hälfte der Platte wird ein Tropfen des zu untersuchenden Serums gegeben.
2. Jedem Tropfen Serum wird ein Tropfen der entsprechenden Test-Erythrozyten-Aufschwemmung hinzugefügt.
3. Erythrozyten und Serum werden mit einem Glasspatel gut vermischt.
4. Nachdem die Platte 15 - 20 min bei Raumtemperatur (+25⁰C) gelegen hat, wird sie leicht rotierend bewegt und das Ergebnis abgelesen.

V. UNTERSUCHUNGEN

1. Testseren

1.1. Titermessungen in Abhängigkeit von Dauer und Temperatur der Lagerung

Fragestellungen

Zusammenhang zwischen Titerabfall und Dauer der Lagerung

Spender für Testseren stehen nicht jederzeit sofort zur Verfügung. So ist zu testen, wie lange "eigenkonservierte Seren" haltbar sind, beziehungsweise wie stark der Titer nach einer bestimmten Lagerungszeit abfällt.

Zusammenhang zwischen Titerabfall und Temperatur während der Lagerung

Große Gebiete der „low income“ Länder liegen in der subtropischen und tropischen Klimazone. Eine Lagerung bei Kühlschranktemperatur ist nicht immer möglich und die Einhaltung der Kühlkette während des Transportes ist oft fraglich. Daher ist es erforderlich, Substanzen, welche in diesen Regionen zum Einsatz kommen sollen, auf ihre Tauglichkeit bei höheren Temperaturen zu prüfen. Es stellt sich die Frage, ob die Titerhöhe der Testseren abhängig ist von der Temperatur der Lagerung.

Durchführung

Dauer der Lagerung

Es wurden Titerbestimmungen nach 8 und 14 Wochen durchgeführt.

Beobachtetes Problem:

Da sich jedoch in der Messung nach 8 Wochen bereits ein erheblicher Titerabfall zeigte, wurde ein neuer Ansatz mit entsprechender Blutgruppenverteilung nötig, um noch Werte nach 4 Wochen zu ermitteln.

Temperatur während der Lagerung

Es wurde bei drei verschiedenen Temperaturen - gemäß unterschiedlicher Bedingungen im Einsatzgebiet - gelagert:

- bei +4⁰C
Dies entspricht der Lagerung in einem Kühlschrank
- bei +25⁰C
Dies entspricht der Lagerung an einem schattigen, gemäßigt temperierten Ort
- bei +37⁰C
Dies entspricht Extrembedingungen unter welchen weder Kühlmöglichkeiten, noch eine Lagerung an einem gemäßigt temperierten Ort möglich ist

V.1.2. Poolen der Testseren

Grundlagen des Poolens

Um adäquate Testseren herzustellen hat man verschiedene Möglichkeiten.

Verwendet man Einzelproben, ist es notwendig eine Titerbestimmung durchzuführen um die Stärke zu erfassen. Diese ist jedoch unter "einfachen Bedingungen" oft nicht durchführbar.

Andererseits besteht die Möglichkeit des Poolens Blutgruppen-gleicher Seren.

Hierdurch kann man mit großer Wahrscheinlichkeit - vorausgesetzt die

Testserumspender erfüllen die allgemeinen Anforderungen - eine genügend hohe Titerstufe erreichen.

Fragestellung

Kann man erwarten, dass nach dem Mischen durchschnittlicher Werte von Einzeleren ein durchschnittlicher Wert des "Poolserums" resultiert?

Es soll überprüft werden, ob nach "Poolen" von drei verschiedenen Seren, der gemessene Gesamttiter dem Mittelwert der errechneten Einzeltiter entspricht.

Durchführung

Es wurden von je neun Seren der Blutgruppe A (Anti-B), der Blutgruppe B (Anti-A) und der Blutgruppe O (Anti-A und Anti-B) die Titer bestimmt. Nach den Einzelmessungen wurden je drei Seren à 2ml der gleichen Blutgruppe nach dem Zufallsprinzip vermischt. Nach dem Mischen wurde erneut eine Titerbestimmung durchgeführt. Es resultierten pro Blutgruppe drei Mischseren à 6 ml, bestehend aus drei Einzeleren. Die **errechneten** Mischwerte und die **gemessenen** Mischwerte wurden miteinander verglichen.

V.1.3. Sterilitätsprüfung der Testseren

Fragestellung

Auf die Bedeutung der Sterilität bei Blutgruppen-Bestimmungs-Testseren wurde im Kapitel II.2.1. eingegangen.

Unter "einfachen Bedingungen" ist die Gefahr höher, dass Testseren mit ubiquitären Keimen kontaminiert werden.

Daher muss folgender Frage nachgegangen werden:

Weisen die Testseren, welche nach einem "low-tech-imitierten" Arbeitsgang hergestellt wurden Verkeimung auf, das heißt zeigt sich nach Ausstrich auf einem Kultur-Nährmedium Wachstum von Mikroorganismen oder ist die Konservierung fähig diese Kontamination abzufangen?

Durchführung

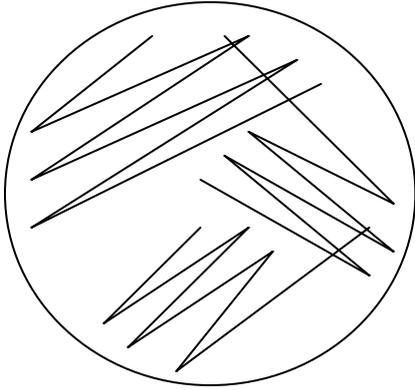
Es wurden 30 Serum-Proben, analog dem in Kapitel III.1. beschriebenen Verfahren, hergestellt. Die Untersuchungen erfolgten am Tag 0, nach 8 Wochen und nach 14 Wochen.

Vor dem ersten Ausstrich auf einer Agarplatte (Tag 0) wurden die Seren folgenden Bedingungen ausgesetzt:

Erste Versuchsreihe

- dreimaliges Eintauchen einer sauberen aber unsterilen Pipette in das frisch konservierte Serum.
- dreimaliges Öffnen und Schließen der Behälter.
- Kontaminieren des Behälterdeckels mit verschmutzter Arbeitsplatte
- Lagerung bei +4 °C, +25 °C und +37 °C über 4 Wochen.

Ausgestrichen wurde nach folgender Technik auf festem Agar-Nährmedium in Petrischalen:



Mit ausgeglühter und wieder abgekühlter Platinöse wird gemäß oben stehender Abbildung zunächst strichförmig die eine Hälfte der Platte beimpft, danach eine neue, sterile Öse genommen und über einen weiteren Quadranten gestrichen und mit einer dritten Öse schließlich das letzte Viertel beimpft.

Anschließend wurden die Petrischalen bei $+37^{\circ}\text{C}$ über 72 Stunden inkubiert. Die Beurteilung über das Wachstum erfolgte nach 72 Stunden.

Die zweite Versuchsreihe erfolgte wie oben beschrieben, jedoch verschärft, durch **sechsmaliges** Eintauchen einer sauberen aber unsterilen Pipette ins konservierte Serum.

Die Lagerung erfolgte bei $+4^{\circ}\text{C}$, $+25^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$ über 8 Wochen.

Die dritte Versuchsreihe erfolgte wie oben beschrieben, jedoch nochmals verschärft, durch **neunmaliges** Eintauchen einer sauberen aber unsterilen Pipette ins konservierte Serum.

Die Lagerung erfolgte bei $+4^{\circ}\text{C}$, $+25^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$ über 14 Wochen.

V.1.4. Belastbarkeitsprüfung durch verschärfte Kontamination der Testseren

Im Sinne einer Belastbarkeitsprüfung des Konservierungsmittels soll der Einfluss einer starken Kontamination getestet werden.

In Absprache mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Würzburg wurden hierfür folgende ubiquitär vorhanden Keime verwendet.

- *Aspergillus niger*
- *Bacillus cereus*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus epidermidis*

Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur der präsentativen Keime

Fragestellung

Im Vorversuch sollte getestet werden bei welcher Temperatur ($+22^{\circ}\text{C}$ oder $+37^{\circ}\text{C}$) die oben genannten Keime ein schnelleres Wachstum aufweisen. Die ermittelte Wachstumstemperatur wird als Inkubationstemperatur der bekeimten Seren im folgenden Versuch verwendet.

Durchführung

Die Keime wurden als Reinkulturen vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Würzburg bezogen. Den Kulturen wurde mit einer Platinöse, nach dem in Kapitel V.1.3. beschriebenen Verfahren Material entnommen und jeder Keim auf zwei Agar-Agar-Petri-Schalen ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte anschließend bei $+25^{\circ}\text{C}$ und bei $+37^{\circ}\text{C}$. Nach 24 und nach 72 Stunden wurden die Kulturen betrachtet und das Wachstum bzw. die Zunahme der Kolonien beurteilt.

Titermessung vor und nach Kontamination

Fragestellung

1. Treten Titerveränderungen oder Panagglutination auf, wenn man die konservierten Testseren mit 5ml einer Keimsuspension ($\approx 10^7$ KBE/ml) auf 200 ml Serum belastet.

Diese Belastung entspricht dem Konservierungsbelastungstest des DAB 9 (1986) (5).

2. Die Differenzierung der Titerveränderung:

a) Besteht ein Unterschied zwischen den verschiedenen Keimen und *Staphylococcus epidermidis*?

b) Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Ausgangstiter vor

Asp

der Kontar

Durchführung

Bei 16 Serumproben (4 Monate alt und bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert) wurden 20 Titerbestimmungen durchgeführt. Fünf Proben hatten die Blutgruppe A (Anti-B), sieben Proben die Blutgruppe B (Anti-A) und vier die Blutgruppe O (Anti-A und Anti-B).

Um eine standardisierte Keimsuspensionen herzustellen, wurde der Mc Farland Standard verwendet. Dabei handelt es sich um einen käuflich erwerblichen Trübungsstandard, mit welchem die gefertigten Keimsuspensionen verglichen wurden. Es sind Trübungsstärken 0,5 – 4 erhältlich. Die folgenden Suspensionen wurden mit Standard 0,5 verglichen.

Anschließend wurden die Serum-Proben gevierteilt und jedem Viertel eine der vier Keimsuspensionen im Verhältnis 200 μl Serum / 5 μl Suspension zugefügt.

Es resultierten 64 Proben ($\approx 205 \mu\text{l}$):

- 16 mit Suspension von *Aspergillus niger*
- 16 mit Suspension von *Bacillus cereus*

- 16 mit Suspension von *Pseudomonas aeruginosa*
- 16 mit Suspension von *Staphylococcus epidermidis*

Die Proben wurden in verschließbaren 10 ml Glasbehältern über 72 Stunden bei +37°C inkubiert. Darauf folgten 80 Titerbestimmungen. Die Blutgruppe 0 besitzt Anti-A und Anti-B, d.h. hier werden doppelt so viele Bestimmungen der 64 kontaminierten Seren durchgeführt.

Vergleichskurve

Fragestellung

Untersucht werden soll, ob eine Titerveränderung innerhalb 72 Stunden bei +37°C von der Kontamination abhängig ist, oder ob sie unter gleichen Bedingungen ohne Kontamination ebenso stattfindet.

Durchführung

Bei 11 nicht kontaminierten Serumproben (4 Wochen bei +37°C) wurden 20 Titerbestimmungen durchgeführt. Eine Probe hatte die Blutgruppe A (Anti-B), eine Probe die Blutgruppe B (Anti-A) und neun Proben die Blutgruppe O (Anti-A und Anti-B). In verschließbaren Glasbehältern wurde über 72 Stunden bei +37°C inkubiert. Darauf folgte eine erneute Titerbestimmung der Proben.

V.2. Testerythrozyten

V.2.1. Agglutinationsverhalten von Testerythrozyten in Abhängigkeit von Dauer und Temperatur der Lagerung

Fragestellung

Zusammenhang zwischen Agglutinationsverhalten und Dauer der Lagerung

Um eine ständige Präsenz von Testerythrozyten zu gewährleisten, ist die Aufbewahrung über eine gewisse Zeit nötig. So ist zu testen, wie lange "eigenkonservierte Testerythrozyten" haltbar sind, bzw. wie stark die Agglutinationsstärke nach einem gewissen Zeitraum abfällt.

Zusammenhang zwischen Agglutinationsverhalten und Temperatur der Lagerung

Ebenso wie bei den Testseren ist es wichtig, die Testerythrozyten auf ihre Tauglichkeit bei höheren Temperaturen zu prüfen. Auch hier stellt sich die Frage, ob die Temperatur der Lagerung Einfluss auf das Agglutinationsverhalten der Testerythrozyten hat.

Durchführung

Getestet wurden 30 Proben von Testerythrozyten, 10 Proben der Blutgruppe A, 10 der Blutgruppe B und weitere 10 der Blutgruppe O. Von den Proben wurden Aufschwemmungen angefertigt und mit den jeweils komplementären Testseren (standardisiert, industriell hergestellt) auf der Tüpfelplatte zur Agglutination gebracht. Das heißt Testerythrozyten der Blutgruppe A mit Anti-A-Serum, Testerythrozyten der Blutgruppe B mit Anti-B-Serum und Testerythrozyten der Blutgruppe O mit Anti-A- und Anti-B-Serum. Die erste Messung erfolgte unmittelbar nach der Konservierung. Dabei wurden die Agglutinationsstärken beurteilt. Anschließend wurden die Proben

geteilt, wobei eine Hälfte bei + 4⁰ C, die andere Hälfte bei +25⁰C gelagert wurde. Nach 15 Tagen erfolgte die zweite Messung, nach 30 Tagen die dritte Messung. Auf eine Lagerung bei höheren Temperaturen sowie über einen längeren Zeitraum wurde abgesehen, da bekannt ist, dass unter nicht physiologischen Verhältnissen eine Hämolyse stattfindet und somit keine korrekten Ergebnisse zu erwarten sind.

V.3. Genauigkeitskontrolle der Testsubstanzen (Anti-A, Anti-B,

Anti-AB, A

V.3.1. Fragestellung

Die Blutgruppenbestimmung erfordert wegen schwerwiegender Folgen bei Fehlbestimmungen höchste Genauigkeit.

Im Folgenden soll gefragt werden, ob die Ergebnisse der eigenhergestellten Testsets mit den handelsüblichen Testsets eine vergleichbare Qualität aufweisen.

V.3.2. Durchführung

Bei 100 Blutproben wurden in einem Zeitraum von 12 Tagen die Blutgruppen bestimmt.

Es wurden drei Bestimmungssets verwendet mittels derer jede Probe dreimal bestimmt wurde.

Jedes Set enthielt:

- Testseren (Fläschchen à 10 ml) mit Anti-A, Anti-B, Anti-AB
- Testerythrozyten (Fläschchen à 10 ml) der Blutgruppen A, B und O.

Die **Testseren** bestanden aus "Pools" à drei Seren. Sie wurden zu Beginn der Bestimmungsreihe bereits über 6 Wochen bei +4° gelagert.

Die gemessenen "Pooltiter" hatten folgende Werte:

Set 1	Anti-A	1:16
	Anti-B	1:16
	Anti-AB	1:16,1:8

Set 2	Anti-A	1:16
	Anti-B	1:8
	Anti-A,B	1:16, 1:16
Set 3	Anti-A	1:16
	Anti-B	1:8
	Anti-A,B	1:16,1:8

Tabelle 5

Die **Testerythrozyten** wurden zu Beginn der Bestimmungsreihe konserviert und über 15 Tage bei +4⁰C gelagert.

Die Aufschwemmungen wurden jeweils am Tag der Bestimmung frisch hergestellt.

Die Bestimmung erfolgte nach dem in Kapitel IV.3. beschriebenen Prinzip.

Die eigenen Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen des Diagnoselabors der Missionsärztlichen Klinik, welche mit handelsüblichen Testsets ausgetestet wurden, verglichen.

VI. VERWENDETE STATISTISCHE METHODEN

Im Folgenden soll nur kurz auf die im Text erwähnten statistischen Begriffe eingegangen werden.

Nach der Anzahl der Variablen (ein, zwei oder viele) die in einem Test untersucht werden bezeichnet man ein Testverfahren als univariat, bivariat oder multivariat.

Mittelwert

Die Berechnung des Mittelwertes stellt ein univariates Verfahren dar. Die genauere Bezeichnung lautet arithmetisches Mittel. Er charakterisiert die Messwerte des Probandenkollektivs und kann als Meßwert des Prototyp´s aufgefaßt werden. (25)

Vorzeichentest

Beim Vorzeichentest handelt es sich um den wahrscheinlich ältesten Test überhaupt. Es wird von einer Binomialverteilung mit $\pi = 0.5$ ausgegangen und man faßt die Anzahl der positiven (+) und negativen (-) Ergebnisse zusammen. Es können Ergebnisse eines Tests oder paarweise Vergleiche innerhalb einer abhängigen Stichprobe in die Berechnung eingehen.

Es werden die Anzahl der positiven und negativen Werte per Hand ausgezählt und man definiert als Prüfgröße (x) die Häufigkeit des seltener vorkommenden Vorzeichens. Wenn man von einer Gleichverteilung der Ergebnisse ausgeht, ist dieses Vorgehen korrekt.

Der Vorzeichentest geht von einer Binomialverteilung mit $\pi = 0.5$ aus. Sowohl positive als auch negative Ausgänge sind gleich wahrscheinlich. (24)

Statistische Signifikanz und p-Wert

Jeder Test liefert einen p-Wert ($p = \text{probability}$), der an einer Signifikanzschranke gemessen wird. Diese Schranke muss vor Versuchsbeginn festgelegt werden. Einen

p-Wert, der kleiner als diese Signifikanzschranke ist, nennt man signifikant. P ist kein Maß für die Größe des Unterschiedes, oder nur in sofern, als größere Unterschiede auch sicherer sind, sondern p ist ein Maß für die Sicherheit, mit der man eine Aussage über die Variablen macht. Meist betrachtet man ein $p < 0.05$ als klein und setzt das Signifikanzniveau auf 0.05 fest. Die statistische Signifikanz ist von der Größe der untersuchten Population abhängig. Wenn die Population genügend groß ist, erlangen schon kleine Unterschiede zwischen zwei Gruppen statistische Signifikanz. (25)

Kendals Rangkorrelationskoeffizient

Korrelationskoeffizienten messen die Stärke der Abhängigkeit zwischen zwei Variablen. 0 bedeutet völlige Unabhängigkeit, 1 völlige Abhängigkeit und -1 heisst gegensinnige Abhängigkeit. (25)

U – Test von Mann und Whitney

Den U-Test von Mann und Whitney verwendet man, wenn man die Beziehung zwischen einem Messwert und einer klassifizierten Variablen testen will. Der U-Test prüft, ob die Werte der Variablen in zwei Gruppen gleich sind. Falls die klassifizierte Variable in mehr als zwei Klassen eingeteilt ist, testet man jede Gruppe gegen jede. Das Ergebnis besteht aus der Angabe der getesteten Variablen, den Mittelwerten und Streuungen der Messwerte in den beiden Klassen und der Testgröße U mit ihrem p-Wert. Der U- Test ist immer gültig, ausser wenn die Messwertvariable sehr viele Rangbildungen, d.h. sehr viele gleiche Werte aufweist und gleichzeitig nicht normal verteilt ist. (25)

Der Chi-Quadrat-Test

Der Chi-Quadrat-Test eignet sich am besten für zwei nominale, also klassifizierte Variablen ohne natürliche Reihenfolge. Auch für diotome Variablen oder ja/nein kann man ihn gut verwenden. Das Ergebnis besteht aus der Kreuztabelle der Anzahlen und aus der Testgröße, mit Ihrer Signifikanz (25).

Kreuztabelle

Eine Kreuztabelle ist eine tabellarische Darstellung der gemeinsamen (bivariaten) Häufigkeitsverteilung zweier »Variablen« X und Y. Sie wird auch Kontingenz-Tabelle genannt. Kreuztabellen eignen sich besonders für die Analyse »kategorialer Variablen«. Haben beide Variablen X und Y dagegen sehr viele »Ausprägungen«, ist diese Form der Darstellung nicht besonders übersichtlich.

Die Kreuztabelle sollte so aufgebaut sein, daß die »unabhängige Variable« X die Spalten und die »abhängige Variable« Y die Zeilen definiert. Ist eine Unterscheidung in abhängige und unabhängige Variable nicht möglich (»symmetrische Fragestellung«), dann sollte man entscheiden, im Hinblick auf welche der beiden Variablen man die Daten anschaulicher interpretieren kann, und diese zur Zielvariablen Y erklären. Die zweite Variable wird dann zur Spaltenvariablen X. (24)

VII. ERGEBNISSE

VII.1. Testseren

VII.1.1. Titermessungen in Abhängigkeit von Dauer und Temperatur der Lagerung

Da es sich bei den Titerwerten nicht um echte Zahlen handelt, musste, um einen statistisch interpretierbaren Wert zu erreichen, eine Umrechnung wie folgt vorgenommen werden:

1:2	1
1:4	2
1:8	3
1:16	4
1:32	5
1:64	6

Tabelle 6

Abhängigkeit des Titerabfalls von der Dauer der Lagerung

Lagerung bei +4⁰C

Werte nach 4 Wochen:

Die Versuchsdurchführung bei +4⁰C ergab, dass die 40 Titerwerte bei einem mittleren Ausgangswert von umgerechnet 4,15 nach 4 Wochen auf einen umgerechneten Mittelwert von 3,55 abfielen.

Das entspricht 85,5% des Ausgangswertes.

Da keine Normalverteilung vorlag, wurde der Vorzeichentest verwendet. Er ergab,

daß von 40 Titerwerten 13 abfielen und keiner zunahm.

Mit einem P von 0,00087 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

In der Kreuztabelle wurde ermittelt, dass 27 Titerwerte gleich blieben, 5 Werte um 1 Stufe, 5 Werte um 2 Stufen und 3 Werte um 3 Stufen abfielen.

Werte nach 8 Wochen:

Nach 8-wöchiger Lagerung bei +4⁰C zeigte sich bei den 40 Titerwerten ein mittlerer Ausgangswert von umgerechnet 4,95. Es erfolgte ein Abfall auf einen mittleren umgerechneten Wert von 4,57.

Dies entspricht 92,3% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß 12 von 40 Titerwerte abfielen und keiner zunahm. Mit einem P von 0,0015 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

In der Kreuztabelle wurde ermittelt, dass 28 Titerwerte gleich blieben, 9 Werte um 1 Stufe und 3 Werte um 2 Stufen abfielen.

Werte nach 14 Wochen:

Nach 14-wöchiger Lagerung bei +4⁰C zeigte sich bei den 40 Titerwerten mit einem mittleren Ausgangswert von umgerechnet 4,95 ein Abfall auf einen mittleren umgerechneten Wert von 4,30.

Das entspricht 86,9% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß 19 von 40 Titerwerten abfielen und keiner zunahm.

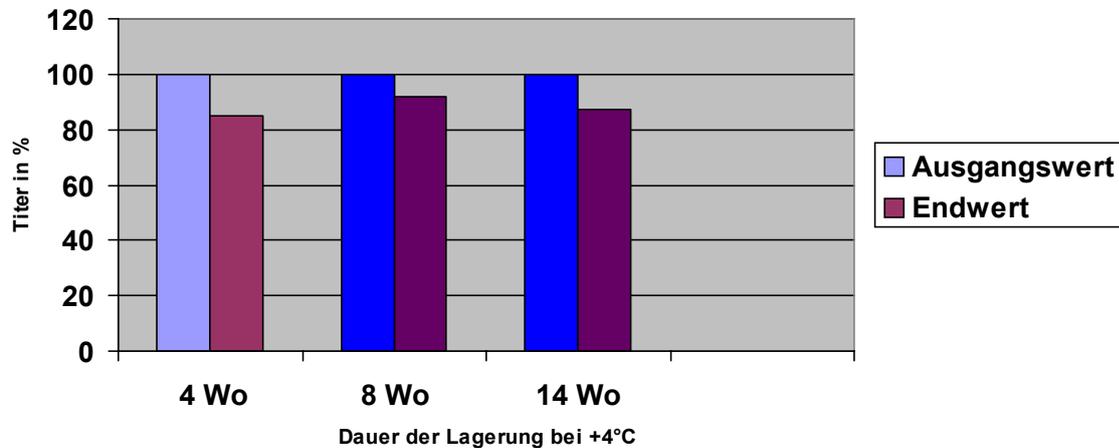
Mit einem P von 0,00004 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

In der Kreuztabelle wurde ermittelt, da• 21 Werte gleich blieben, 13 Titerwerte um 1 Stufe abfielen, 5 Werte um 2 Stufen und 1 Wert um 3 Stufen abfiel.

Werte nach 8 und 14 Wochen:

Vergleicht man die 40 Titerwerte, mit gleichem Ausgangswert, nach 8-wöchiger und 14-wöchiger Lagerung, so zeigte sich im Vorzeichentest, daß 10 von 40 Werten nach 14 Wochen Lagerung tiefer als nach 8-wöchiger Lagerung lagen. Kein Wert lag höher.

Mit einem P von 0,00443 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.



Graphik 1

Zusammenfassende Graphik des Titer-Mittelwertes unter Lagerung bei 4°C.

Die Titerwerte nach 4 Wochen, 8 Wochen und 14 Wochen wurden verglichen mit dem Titer am Tag 0.

Es ist zu beachten, daß es sich bei den Ergebnissen nach 4 Wochen um eine andere Charge handelt, als nach 8 und 14 Wochen

Lagerung bei +25°C

Werte nach 4 Wochen:

Die Versuchsdurchführung bei +25°C ergab, daß die 40 Titermessungen bei einem mittleren Ausgangswert von umgerechnet 4,15 nach 4 Wochen auf einen umgerechneten Mittelwert von 3,45 abfielen.

Dies entspricht 83,1% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß 18 von 40 Titerwerten abfielen und keiner zunahm.

Mit einem P von 0,00006 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

In der Kreuztabelle wurde ermittelt, daß 22 Titerwerte gleich blieben, 10 um eine Stufe, 7 um 2 Stufen und 1 um 4 Stufen abfielen.

Werte nach 8 Wochen:

Nach 8-wöchiger Lagerung bei +25⁰C zeigten die 40 Titerwerte bei einem mittleren Ausgangswert von umgerechnet 4,95 ein Abfall auf einen mittleren Wert von 4,27.

Dies entspricht 86,3% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß 17 von 40 Titerwerten abfielen und keiner zunahm.

Mit einem P von 0,0001 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

In der Kreuztabelle wurde ermittelt, da• 23 Titerwerte gleich blieben, 10 um 1 Stufe, 5 um 2 Stufen und 2 um 3 Stufen abfielen. Hier ist zu erwähnen, da• 1 Wert den Titer 0 erreichte.

Werte nach 14 Wochen:

Nach 14-wöchiger Lagerung bei +25⁰C zeigten die 40 Titerwerte bei einem mittleren Ausgangswert von umgerechnet 4,95 einen Abfall auf einen mittleren umgerechneten Wert von 3,92.

Dies entspricht 79,2% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß 24 von 40 Titerwerten abfielen und keiner zunahm.

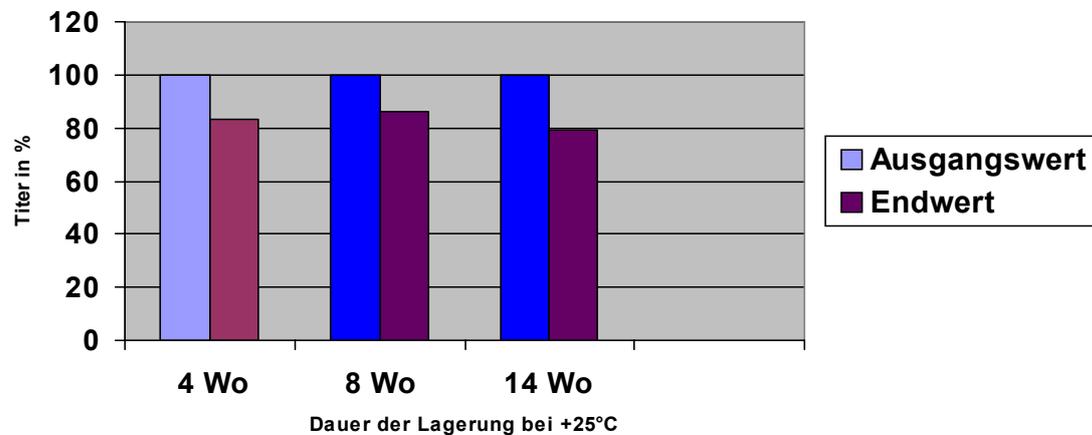
Mit einem P von 0,00000 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

In der Kreuztabelle wurde ermittelt, da• 16 Titerwerte gleich blieben, 14 Werte um 1 Stufe abnahmen, 5 Werte um 2 Stufen, 4 Werte um 3 Stufen und 1 Wert um 4 Stufen.

Werte nach 8 und 14 Wochen:

Vergleicht man die 40 Titerwerte nach 8- und nach 14-wöchiger Lagerung, so zeigte sich im Vorzeichentest, daß 13 von 40 Werten nach 14-wöchiger Lagerung tiefer als nach 8-wöchiger Lagerung und 1 Wert höher lagen.

Mit einem P von 0,00328 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.



Graphik 2

Zusammenfassende Graphik des Titer-Mittelwertes unter Lagerung bei 25°C.

Die Titerwerte nach 4 Wochen, 8 Wochen und 14 Wochen wurden verglichen mit dem Titer am Tag 0.

Lagerung bei +37°C

Werte nach 4 Wochen:

Die Versuchsdurchführung bei +37°C ergab, daß die 40 Titermessungen mit einem mittleren Ausgangswert von umgerechnet 4,15 nach 4 Wochen auf einen Mittelwert von umgerechnet 3,40 abfielen.

Dies entspricht 81,9% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß 18 von 40 Titerwerten abfielen und keiner zunahm.

Mit einem P von 0,00006 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

In der Kreuztabelle wurde ermittelt, daß 22 Titerwerte gleich blieben, 11 um 1 Stufe, 3 um 2 Stufen, 3 um 3 Stufen und 1 um 1 Stufe abfielen.

Werte nach 8 Wochen:

Nach 8-wöchiger Lagerung bei +37°C zeigte sich bei einem mittleren umgerechneten

Ausgangswert der 40 Titerwerte von 4,95 ein Abfall auf einen mittleren Wert von 3,60.

Dies entspricht 72,7% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß 27 von 40 Titerwerten abfielen und keiner zunahm. Mit einem P von 0,00000 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

In der Kreuztabelle wurde ermittelt, daß 13 Titerwerte gleich blieben, 9 um 1 Stufe, 11 um 2 Stufen, 5 um 3 Stufen und 2 um 4 Stufen abfielen.

Werte nach 14 Wochen:

Nach 14-wöchiger Lagerung bei +37⁰C zeigte sich, bei einem mittleren umgerechneten Ausgangswert der 40 Titerwerte von 4,95 ein Abfall auf einen mittleren umgerechneten Wert von 1,45.

Das entspricht 29,3% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß 39 von 40 Titern abfielen und keiner zunahm. Mit einem P von 0,00000 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

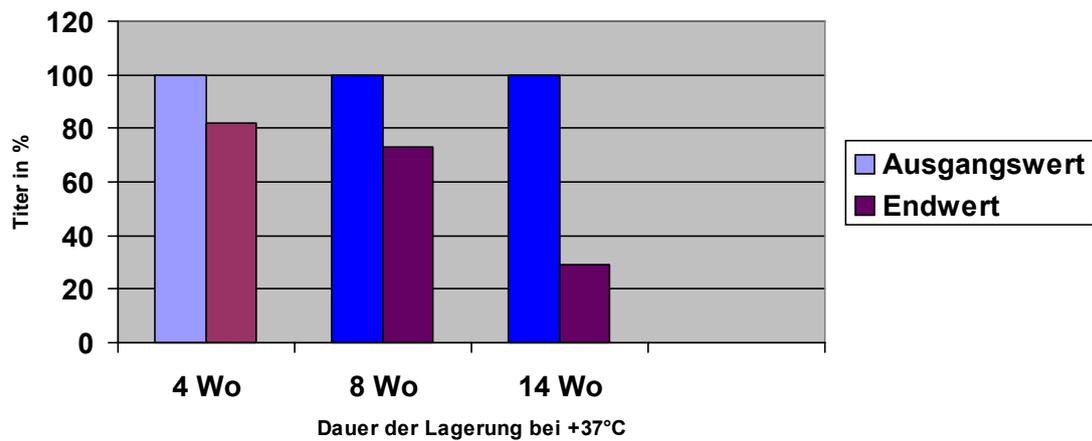
In der Kreuztabelle wurde ermittelt, daß 1 Titerwert gleich blieb, 1 um 1 Stufe, 6 um 2 Stufen, 13 um 3 Stufen, 10 um 4 Stufen, 6 um 5 Stufen und 3 um 6 Stufen abfielen.

Hier ist zu erwähnen, daß 13 Werte den Titer 0 erreichten.

Werte nach 8 und 14 Wochen:

Vergleicht man die 40 Titerwerte nach 8-wöchiger und 14-wöchiger Lagerung, so zeigt sich im Vorzeichentest, daß 35 von 40 Werten nach 14-wöchiger Lagerung tiefer lagen als nach 8-wöchiger Lagerung. Kein Wert lag höher.

Mit einem P von 0,00000 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.



Graphik 3

Zusammenfassende Graphik des Titer-Mittelwertes unter Lagerung bei 37°C.

Die Titerwerte nach 4 Wochen, 8 Wochen und 14 Wochen wurden verglichen mit dem Titer am Tag 0.

Es ist zu beachten, dass es sich bei den Ergebnissen nach 4 Wochen um eine andere Charge handelt, als nach 8 und 14 Wochen

Abhängigkeit des Titerabfalls von der Temperatur der Lagerung

Lagerung über 4 Wochen

Die 40 Titerwerte mit einem mittleren umgerechneten Ausgangswert von 4,15 hatten nach Lagerung bei Temperaturen von +4°C, +25°C und +37°C über 4 Wochen Dauer folgende umgerechnete Mittelwerte:

	Mittelwert	in % des Ausgangswertes
+4°C	3,55	85,5
+25°C	3,45	83,1
+37°C	3,40	81,9

Tabelle 7

Im Vorzeichentest zeigte sich, daß bei **+4°C** 9 von 40 Titerwerten höher als bei **+25°C**, und 7 Werte tiefer lagen.

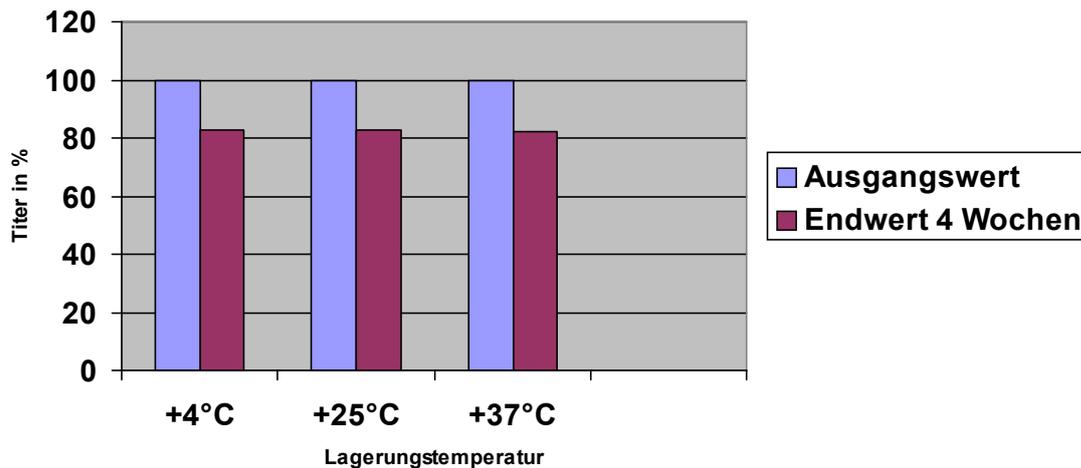
Mit einem P von 0,80259 ist dies **nicht signifikant** verschieden.

Im Vorzeichentest zeigte sich, daß bei **+4°C** 10 von 40 Titerwerten höher als bei **+37°C** sowie 5 tiefer lagen.

Mit einem P von 0,30170 ist dies **nicht signifikant** verschieden.

Im Vorzeichentest zeigte sich, daß bei **+25°C** 10 von 40 Titerwerten höher als bei **+37°C** und 8 tiefer lagen.

Mit einem P von 0,81366 ist dies **nicht signifikant** verschieden.



Graphik 4

Zusammenfassende Graphik des Titer- Mittelwertes nach 4 Wochen bei +4⁰C, +25⁰C und +37⁰C Lagerungstemperatur verglichen mit dem Titer am Tag 0.

Lagerung über 8 Wochen

Die 40 Titerwerte mit einem mittleren Ausgangswert von umgerechnet 4,95 hatten nach Lagerung bei Temperaturen von +4⁰C, +25⁰C und +37⁰C über 8 Wochen Dauer folgende Mittelwerte:

	Mittelwert	in % des Ausgangswertes
+4⁰C	4,57	92,3
+25⁰C	4,27	86,3
+37⁰C	3,60	72,7

Tabelle 8

Im Vorzeichentest zeigte sich, daß:

bei **+4⁰C**, 9 von 40 Titerwerten höher als bei **+25⁰C** und 3 Werte tiefer lagen.

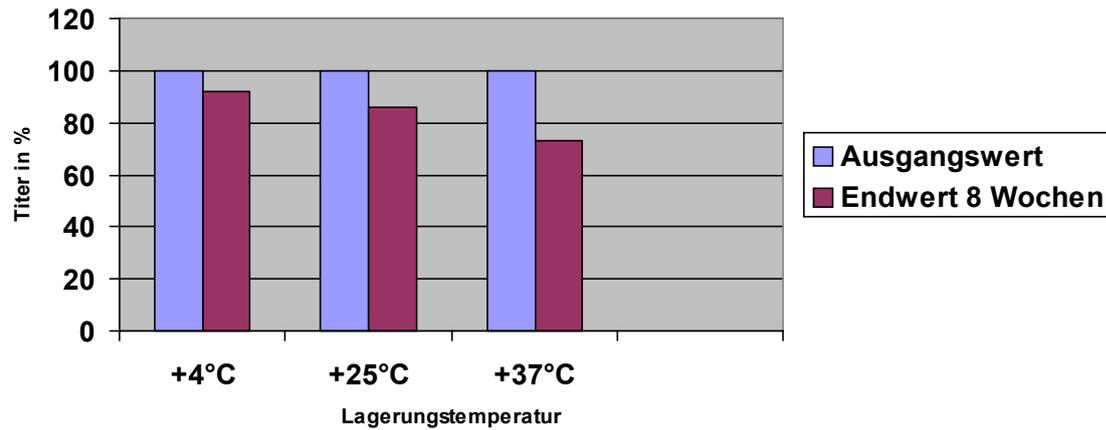
Mit einem P von 0,14891 ist dies **nicht signifikant** verschieden.

bei **+4°C**, 23 von 40 Titerwerte höher als bei **+37°C** und 1 Wert tiefer lagen.

Mit einem P von 0,00002 ist dies **signifikant** verschieden.

bei **+25°C**, 18 von 40 Titerwerten höher als bei **+37°C** und 1 Wert tiefer lagen.

Mit einem P von 0,00024 ist dies **signifikant** verschieden.



Graphik 5

Zusammenfassende Graphik des Titer- Mittelwertes nach 8 Wochen bei +4°C, +25°C und +37°C Lagerungstemperatur verglichen mit dem Titer am Tag 0.

Lagerung über 14 Wochen

Die 40 Titerwerte mit einem mittleren Ausgangswert von 4,95 hatten nach Lagerung bei Temperaturen von +4°C, +25°C und +37°C über 14 Wochen Dauer folgende Mittelwerte:

	Mittelwert	in % des Ausgangswertes
+4°C	4,30	86,9
+25°C	3,92	79,2
+37°C	1,45	29,3

Tabelle 9

Im Vorzeichentest zeigte sich, daß:

bei +4°C, 13 von 40 Titerwerten höher als bei +25°C und 4 tiefer lagen.

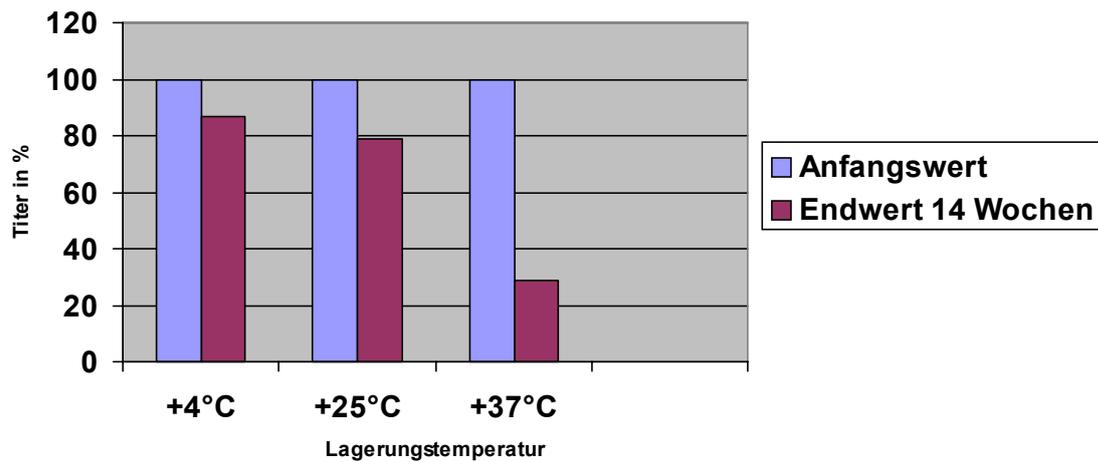
Mit einem P von 0,05234 ist dies **nicht signifikant** verschieden.

bei +4°C, 37 von 40 Titerwerten höher als +37°C und keiner tiefer lagen.

Mit einem P von 0,00000 ist dies **signifikant** verschieden.

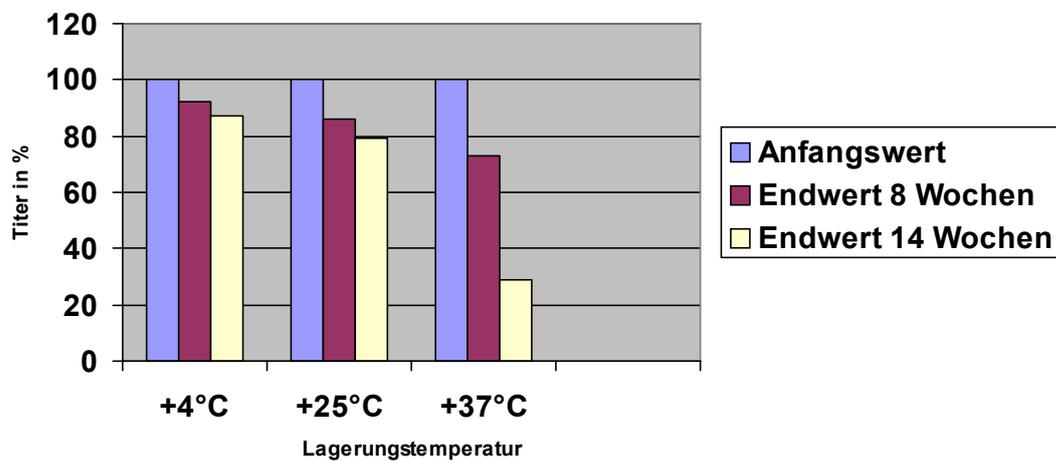
bei +25°C, 35 von 40 Titerwerten höher als bei +37°C und 1 tiefer lagen

Mit einem P von 0,00000 ist dies **signifikant** verschieden.



Graphik 6

Zusammenfassende Graphik des Titer- Mittelwertes nach 14 Wochen bei +4⁰C, +25⁰C und +37⁰C Lagerungstemperatur verglichen mit dem Titer am Tag 0.



Graphik 7

Zusammenfassende Graphik des Titer-Mittelwertes nach 8 Wochen und nach 14 Wochen in Abhängigkeit von der Lagerungs-Temperatur bei +4⁰C, +25⁰C und +37⁰C, verglichen mit dem Titer am Tag 0.

VII.1.2. Poolen der Testseren

Der **errechnete gepoolte** Wert der 12 Pools à 3 Proben lag bei einem umgerechneten Mittelwert von 3,49.

Der **unmittelbar nach dem Poolen gemessene** Wert der 12 Pools à 3 Proben lag bei 3,50.

Die Kendalls Rang Korrelation (für nicht normalverteilte Werte) zwischen **gemessenem** und **errechnetem gepoolten** Titer lag bei $R=0,747$ (mit $N=12$). Mit einem P von 0,0007 ist die Abhängigkeit der beiden Variablen **signifikant**.

In der Kreuztabelle zeigte sich, daß

- 3 Werte im Vergleich zwischen gemessenen und errechneten Titern gleich hoch waren
- 5 Werte beim gemessenen Titer tiefer lagen als beim errechneten
- 4 Werte beim gemessenen Titer höher lagen als beim errechneten.

VII.1.3. Sterilitätsprüfung der Testseren

Die erste Sterilitätsprüfung der Testseren (Ausstrich auf der Petrischale) erfolgte direkt nach Konservierung frischer (maximal 2 Tage alter) Seren. Nach Inkubation bei +37°C über 72 Stunden zeigte sich bei **keiner** der 30 Proben ein **Wachstum** von Mikroorganismen.

Die zweite Sterilitätsprüfung erfolgte nach 8 Wochen Lagerung unter drei verschiedenen Temperaturen (+4°C, +25°C, +37°C). Auch hier zeigte sich bei allen 90 Proben nach oben beschriebener Inkubation **keinerlei Wachstum**.

Die dritte Sterilitätsprüfung wurde nach 14 Wochen Lagerung unter oben genannten Bedingungen durchgeführt. Wiederum konnte bei **keiner** der 90 Proben nach oben beschriebener Inkubation **Wachstum** nachgewiesen werden.

**VII.1.4. Belastbarkeitsprüfung durch verschärfte Kontamination der
- Aspergillus niger, Bacillus cereus, Pseudomonas**

**Testseren
aeruginos**

Vorversuch

Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich bei allen vier Keimen folgendes Ergebnis:

- bei +25⁰C: kein Wachstum
- bei +37⁰C: gering bis starkes Wachstum

Nach 72-stündiger Inkubation zeigte sich:

- bei +25⁰C: gering bis starkes Wachstum
- bei +37⁰C: mässig bis sehr starkes Wachstum

Stunden	+22°C				+37°C			
	St.e.	Ps.ae.	Bac.c.	Asp.n.	St.e.	Ps.ae.	Bac.c.	Asp.n.
0	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	+	+++	+++	++
72	-	++	+++	+	++	++++	++++	++++

Tabelle 10

- keine Kolonien
- + weniger als 10 Kolonien
- ++ 10-20 Kolonien
- +++ 20-50 Kolonien
- ++++ Kolonienrasen

Da bei 37°C die stärkere Wachstumstendenz verzeichnet wurde, erfolgte die weitere Inkubation bei dieser Temperatur.

Titermessung vor und nach Kontamination

80 Proben wurden vor und nach Kontamination und Inkubation, bei 37°C über 72 Stunden, verglichen. Die Kontamination erfolgte mit oben genannten Keimen. Im Vorzeichentest zeigte sich, daß 14 von 80 Werten abfielen und keiner zunahm. Mit einem P von 0,00051 ist diese Abnahme **signifikant**.

Differenzierung der Titerveränderungen:

- a) Untersucht man, ob sich zwischen den 4 verschiedenen **Keimen** ein Unterschied in der Höhe des Titerabfalls zeigt, so ergibt der U-Test von Mann und Whitney, daß sie untereinander **keine signifikanten** Unterschiede im Abfall zeigen.

Die einzelnen Werte sind in folgender Tabelle einzusehen.

Anzahl der Proben: 80

	Aspergillus niger	Bacillus cereus	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus epidermidis
Titer vor und nach Kontamination gleich	17	15	15	19
Titerabfall um je eine Stufe nach Kontamination	3	5	5	1

Tabelle 11

- b) Wird untersucht, ob sich ein Zusammenhang findet zwischen **Ausgangstiter** vor Kontamination und der Höhe des Abfalls, so findet sich mittels Messung des Kendalls-Rangkorrelationskoeffizienten ein p-

Wert von 0,0943.

Das heißt, es herrscht **kein signifikanter** Zusammenhang.

Vergleichskurve ohne Kontamination

Die 20 Ausgangswerte der Vergleichskurve hatten einen umgerechneten Mittelwert von 4,4. Nach Inkubation über 72 Stunden bei +37°C fiel der Mittelwert auf 4,2 ab.

Im Vorzeichentest zeigte sich, daß 4 von 20 Werten abfielen und keiner zunahm. Mit einem P von 0,00000 ist diese Abnahme **signifikant**.

Vergleicht man nun die Werte der kontaminierten Seren mit jenen der nicht kontaminierten, so zeigen sich folgende Werte

Ohne Kontamination	Aspergillus niger	Bacillus cereus	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus epidermidis
4,2	4,2	4,15	4,15	4,35

Nach dem U-Test von Mann und Whitney ist dieser Unterschied mit einem P von 0,71658 **nicht signifikant**.

VII.2. Testerythrozyten

VII.2.1. Abhängigkeit des Agglutinationsverhaltens von der Dauer der Lagerung

Lagerung bei +4°C

Werte nach 15 Tagen

Die Versuchsdurchführung bei +4°C ergab, daß die 30 Werte der Agglutinationsstärke bei einem mittleren Ausgangswert von 2,0 (Streuung: 1,597) nach 15 Tagen auf einen Mittelwert von 1,70 abfielen.

Dies entspricht 85% des Ausgangswertes.

Da keine Normalverteilung vorlag, wurde der Vorzeichentest verwendet. Er ergab, daß von 30 Werten 10 abfielen und 1 zunahm.

Mit einem P von 0,01586 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

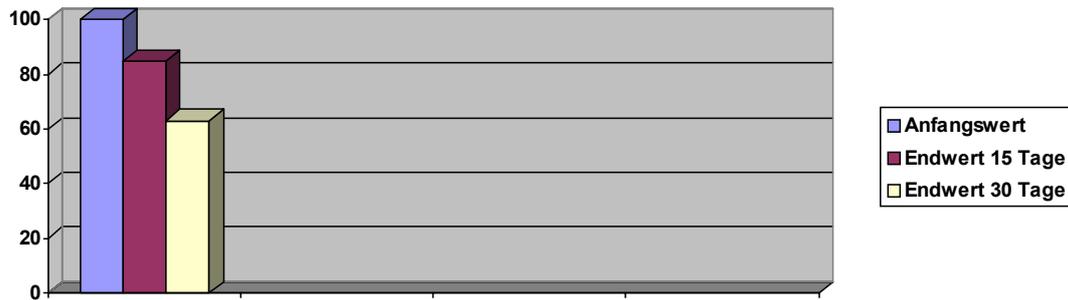
Werte nach 30 Tagen

Nach 30-tägiger Lagerung bei +4°C zeigte sich bei einem mittleren Ausgangswert von 2,0 bei 30 Werten ein Abfall auf einen mittleren Wert von 1,27

Dies entspricht 63% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß von 30 Werten 16 abfielen und keiner zunahm. Mit einem P von 0,00018 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

Agglutinationsstärke in %



Lagerung bei +4°C

Graphik 8

Zusammenfassende Graphik der Agglutinationsstärke nach 15 Tagen und 30 Tagen bei +4°C Lagerungstemperatur verglichen mit Tag 0

Lagerung bei +25°C

Werte nach 15 Tagen

Die Versuchsdurchführung bei 25°C ergab, daß 30 Werte bei einem mittleren Ausgangstiter von 2,0 nach 15 Tagen auf einen Mittelwert von 1,43 abfielen.

Dies entspricht 72% des Ausgangswertes

Der Vorzeichentest ergab, daß von 30 Werten 15 abfielen und keiner zunahm.

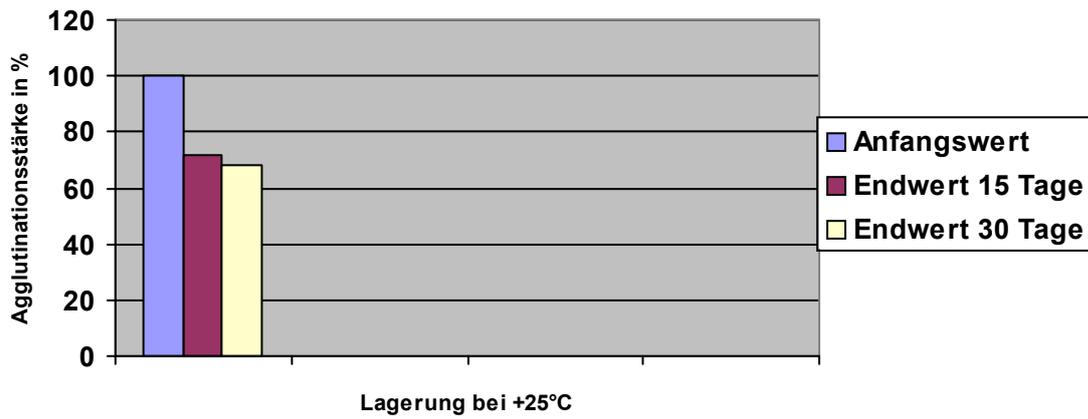
Mit einem P von 0,00030 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.

Werte nach 30 Tagen

Nach 30-tägiger Lagerung bei +25°C zeigte sich bei einem mittleren Ausgangswert von 2,0 der 30 Werte ein Abfall auf einen mittleren Wert von 1,37.

Dies entspricht 68% des Ausgangswertes.

Der Vorzeichentest ergab, daß von 30 Werten 16 abfielen und keiner zunahm. Mit einem P von 0,00018 ist diese Verschiedenheit **signifikant**.



Graphik 9

Zusammenfassende Graphik der Agglutinationsstärke nach 15 Tagen und 30 Tagen bei +25°C Lagerungstemperatur verglichen mit Tag 0

VII.2.2. Abhängigkeit des Agglutinationsverhaltens von der Temperatur der Lagerung

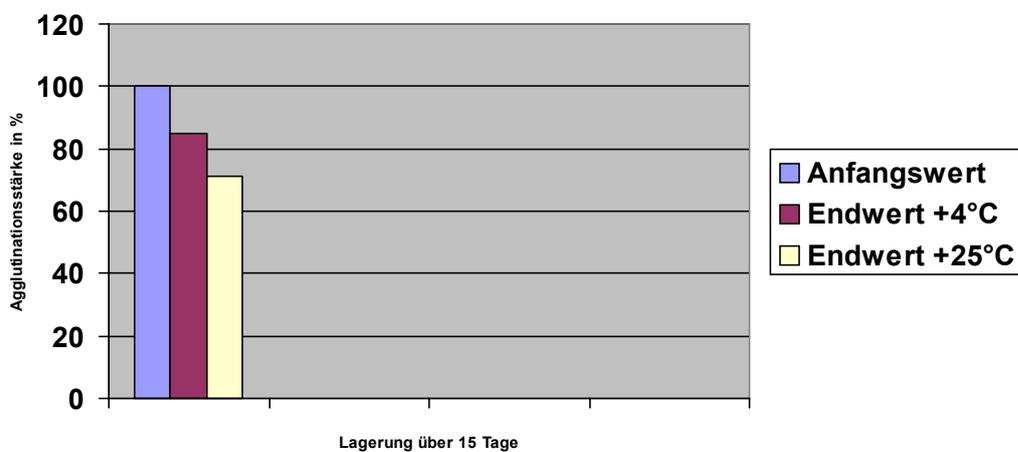
Lagerung über 15 Tage

Die 30 Werte der Agglutinationsstärke mit einem mittleren Ausgangswert von 2,0 hatten nach Lagerungstemperaturen bei +4°C und +25°C über 15 Tage folgende Mittelwerte:

	Mittelwert	in % des Ausgangswertes
+4°C	1,70	85,0
+25°C	1,43	71,5

Tabelle 12

Im Vorzeichentest zeigte sich, daß bei +4°C 9 von 30 Werten höher lagen als bei +25°C sowie 1 Wert tiefer lag. Mit einem P von 0,02686 ist dies **signifikant** verschieden.



Graphik 10

Zusammenfassende Graphik der Agglutinationsstärke nach 15 Tagen bei +4°C und

+25°C Lagerungstemperatur verglichen mit Tag 0.

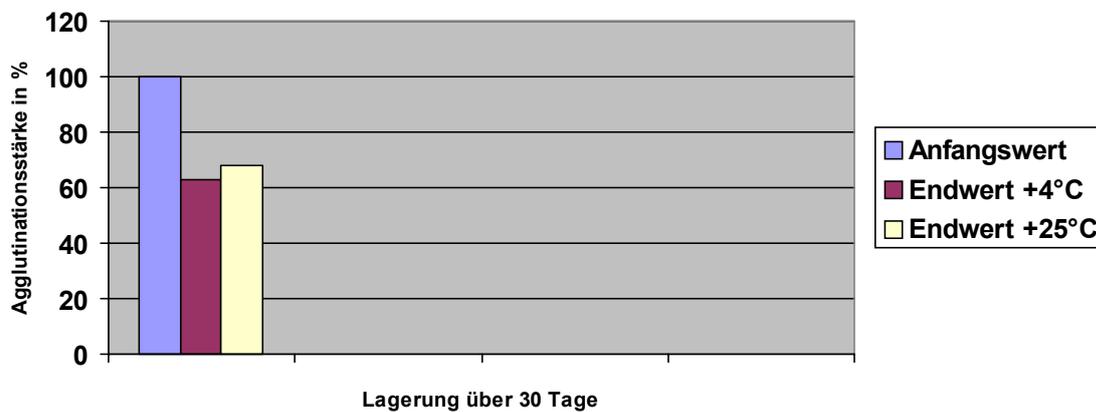
Lagerung über 30 Tage

Die 30 Werte der Agglutinationsstärke mit einem mittleren Ausgangswert von 2,0 hatten nach Lagerung bei +4°C und +25°C über 30 Tage folgende Mittelwerte:

	Mittelwert	in % des Ausgangswertes
+4°C	1,27	63,3
+25C	1,37	68,3

Im Vorzeichentest zeigte sich, daß bei +4°C Lagerungstemperatur 5 von 30 Werten höher lagen als bei +25°C und 5 Werte tiefer.

Mit einem P von 0,75183 ist dies **nicht signifikant** verschieden.



Graphik 11

Zusammenfassende Graphik der Agglutinationsstärke nach 30 Tagen bei +4°C und +25°C Lagerungstemperatur verglichen mit Tag 0

VII.3. Genauigkeitskontrolle der Testseren Anti-A, Anti-B, Anti-AB, sowie der Testerythrozyten A, B,O zur Blutgruppenbestimmung

Es wurden 100 Blutgruppenbestimmungen durchgeführt.

Jede Blutprobe wurde mit 3 Sets getestet.

36 Proben hatten die Blutgruppe O, 46 Proben die Blutgruppe A, 15 Proben die Blutgruppe B und 3 Proben die Blutgruppe AB.

Das Ergebnis entsprach in allen 100 Fällen dem Ergebnis des Diagnoselabors der Missionsärztlichen Klinik.

Nach den exakten Vertrauensgrenzen für die Binominalverteilung (10) heißt es, daß mit 95%-iger Sicherheit 0 - 3,62 Falschbestimmungen, bzw. mit 99%-iger Sicherheit 0 - 5,16 Falschbestimmungen auftreten können.

Betrachtet man die Agglutinationsstärken der verschiedenen Bestimmungen, ergeben sich folgende gemittelte Werte der drei Chargen.

Blutgruppe 0

Anzahl der Proben : 36

Stärke der Agglutination	0	1	2	3	4	Ergebnis
Testseren						
Anti – A	36					-
Anti – B	36					-
Anti – AB	36					-
Testerythrozyten						
A			5	15	16	+
B		3	5	15	13	+
0	36					-

Tabelle 14

Bei Blutgruppe O zeigte sich deutlich die zuverlässige Aussagekraft der Testseren mit der korrekterweise nicht vorhandenen Agglutination.

Lediglich bei den B - Testerythrozyten zeigte sich bei 3 Blutproben nur eine schwache Agglutination.

Im Kontext der ganzen Testung war jedoch eine eindeutige Bestimmung möglich.

Blutgruppe A

Anzahl der der Proben : 46

Stärke der Agglutination	0	1	2	3	4	Ergebnis
Testseren						
Anti – A				15	31	+
Anti – B	46					-
Anti – AB			1	14	31	+
Testerythrozyten						
A	46					-
B		6	11	20	9	+
0	46					-

Tabelle 15

Bei Blutgruppe A zeigten sich ebenfalls im Bereich der Testseren eindeutige Ergebnisse.

Bei den B-Testerythrozyten liegt in 6 Fällen nur eine schwache Agglutination vor. Wiederum konnte aber im Kontext eine eindeutige Bestimmung erfolgen.

Blutgruppe B

Anzahl der Proben: 15

Stärke der Agglutination	0	1	2	3	4	Ergebnis
--------------------------	---	---	---	---	---	----------

Testseren						
Anti – A	15					-
Anti – B		1	3	7	4	+
Anti – AB			4	7	4	+
Testerythrozyten						
A		1	2	7	5	+
B	15					-
0	15					-

Tabelle 16

Bei Blutgruppe B fand sich sowohl beim Anti-B-Serum als auch bei den A-Erythrozyten eine schwache Agglutination. Wahrscheinlich handelte es sich hierbei um die Probe eines sehr kranken Patienten mit geringer Agglutinationsfähigkeit. Dennoch konnte auch in diesem Fall eine eindeutige Aussage stattfinden.

Blutgruppe AB

Anzahl der Proben: 3

Stärke der Agglutination	0	1	2	3	4	Ergebnis
Testseren						
Anti – A		1		1	1	+

Anti – B		1		1	1	+
Anti – AB				1	2	+
Testerythrozyten						
A	3					-
B	3					-
0	3					-

Tabelle 17

Von Blutgruppe AB lagen nur 3 Proben vor. Die Testseren Anti-A und Anti-B liefern in je einem Fall nur eine schwache Agglutination.

Dennoch konnte aufgrund der Aussage der übrigen Testsubstanzen eine eindeutige Blutgruppenbestimmung erfolgen.

Mittelwert der Agglutination

	Mittelwert
Anti – A	1,75
Anti – B	0,52
Anti – AB	2,23
A	1,67
B	2,35

0	0
---	---

Tabelle 18

Die oben stehende Tabelle zeigt, daß erhebliche Unterschiede in der Agglutinationsfähigkeit der verschiedenen Testsubstanzen bestehen.

Diese spiegeln sich in vorher aufgeführten Testchargen wieder.

VII.4. Fehlerquellen

Diskrepanzen in der Blutgruppenbestimmung können durch allgemein bekannte Fehlerquellen verursacht werden, wie falsche Technik, Verfall der Reagenzien, Pseudoagglutination (Geldrollenbildung) oder durch Autoagglutination (15).

Laut WHO gehen 40-60% der Laborfehler auf nicht-analytische Gründe z.B. Verwechslungen zurück.

Verfall und Kontamination der Reagenzien

Folgende Faktoren können die korrekte Bestimmung von Blutgruppen verhindern:

- Abgelaufene oder kontaminierte Reagenzien
- Inkorrekt präparierte Testsubstanzen
- Verschmutzte physiologische Kochsalzlösung

Pseudoagglutination (Geldrollenbildung)

Eine Geldrollen-ähnliche Aneinanderreihung von Erythrozyten kann eine Agglutination vortäuschen. Diese kann entstehen durch Proteinabnormitäten (z.B. bei multiplem Myelom) oder nach intravenöser Verabreichung von Dextran und ähnlichen Produkten. Die Unterscheidung zwischen Agglutination und Pseudoagglutination erfolgt mikroskopisch oder durch die Zuführung von Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1, welche die Pseudoagglutination innert 1-2 Minuten auflöst.

Autoagglutination

Manchmal enthalten Seren Autoagglutinine, d.h. Antikörper welche gegen körpereigene und fremde Erythrozyten reagieren. Es ist bekannt das diese bei malignen Lymphomen, Leukämie, Viruspneumonie, systemischem Lupus erythematosus und anderen Autoimmunerkrankungen sowie gelegentlich bei schwerer Malaria tropica auftritt. Ein häufiger Grund der Autoagglutination bei Raumtemperatur ist das Vorhandensein von Kälteagglutininen.

Existieren Autoagglutinine, so agglutinieren die Erythrozyten vor der Bestimmung.

Dies kann durch eine Autokontrolle bestätigt werden.

Wenn Kälteagglutinine vermutet werden, sollten die Erythrozyten in warmer Kochsalzlösung gewaschen und die Bestimmung nach Inkubation bei 37° C wiederholt werden.

Falsche Technik und Verwechslung

Nur bei dem Verdacht eines technischen Fehlers oder einer Verwechslung ist die Bestimmung unbedingt zu wiederholen.

Mögliche Herstellungsfehler

Testseren

Stehen keine Kühlmöglichkeiten zur Verfügung, so ist die Entfernung der irregulären Kälteagglutinine nicht gegeben.

Führt man die Blutgruppenbestimmung auf 18° - 20°C warmen Platten durch, läßt sich diese Störung vermeiden.

Testerythrozyten

Bei der Verwendung von Testerythrozyten ist zu beachten, daß die Vollblut-Konserve keine Zeichen der Hämolyse aufweisen darf.

In diesem Falle ist sie zu verwerfen.

VII.5. Kosten

VII.5.1. Anschaffungskosten

Für die Herstellung der Testsubstanzen zur Blutgruppen-Bestimmung sind folgende Geräte nötig.

Die Höhe der Kosten beziehen sich auf die Angaben von „Technologie Transfer Marburg in die Ditte Welt e.V.-TTM“

- Handzentrifuge mit Rotor 4x15 ml mit Kunststoffhülsen (ca. 3000 U/min), 1 St.	110.00 Euro
- Eppendorfpipette à 1ml, 1 St.	94.50 Euro
- Eppendorfpipette à 10 µl, 1 St.	94.50 Euro
- Präzisions-Schiebegewichtwaage, Kern, mit Stativ, Genauigkeit 0,05 g, Wägebereich 101 g, 1St.	62.50 Euro
- Tüpfelplatte, Klarglas, mit Deckscheibe, 4x4cm, 1 St.	1,40 Euro
- Glasrührstäbe 150x6 mm, 100 St.	37.00 Euro
- Pasteurpipetten aus Polyäthylen, 1ml, 500 St.	10.00 Euro

VII.5.2. Laufende Kosten

An laufenden Kosten sind zu verzeichnen:

- Natriumazid, reinst, 100g	25.00 Euro
- 0.9% NaCl Lösung, 1Liter	1.50 Euro
- Einwegspritzen 10 ml nach DIN, 12x 100 St.	46.10 Euro
- Einwegkanüle Gr.2, 21Gx1,5, grün, Ø 0.8 mm, 40 mm, 100 St.	1.30 Euro
- Schraubbecher, 100ml, Polypropylen mit Deckel, steril, 200 St.	47.30 Euro

-	Aqua destillata, 5l	2.90 Euro
-	Trinatriumcitrat Dihydrat, Firma Merck, 500g	25.75 Euro
-	Formaldehydlösung, 37% stabilisiert, 1l	14.10 Euro

VII.6. Einfachheit der Herstellung

Die Herstellung von Testsubstanzen zur Blutgruppenbestimmung erfordert keine vertieften labortechnischen Kenntnisse und Fähigkeiten. Eine routinierte Laborfachkraft kann ohne weiteres in die Technik eingearbeitet werden.

Die Beschaffung der Substanzen sollte auch in abgelegenen, kleinen Hospitälern möglich sein. Die Konservierungsstoffe sind kostengünstig und der Transport ohne Kühlkette möglich. Natriumazid bedarf allerdings aufgrund seiner hohen Toxizität einer besonders abgesicherten Transportbehandlung.

Die Bestimmung der Blutgruppen mittels Beurteilung der Agglutination auf der Tüpfelplatte kann für den Ungeübten anfangs Schwierigkeiten bereiten.

Bei wiederholtem Training ist dies jedoch gut erlernbar.

Bei unklarem Ergebnis ist stets eine Wiederholung durchzuführen.

VII.7. Zeitaufwand

Für die Herstellung von 10 ml Testsubstanz müssen folgende Zeiten veranschlagt werden:

Testserum

Herstellung der Natriumazid-Stammlösung	circa 5 Minuten
Blutentnahme	circa 5 Minuten
Kühlung des Blutes	circa 12 Stunden
Zentrifugieren	circa 5 Minuten
Pipettieren und Konservieren	circa 5 Minuten

Testerythrozyten

Herstellung der Natriumcitrat- und Formalinlösung	circa 5 Minuten
---------------------------------------------------	-----------------

Blutentnahme	circa 5 Minuten
Konservieren	circa 5 Minuten
Herstellung der Blutkörperchen-Aufschwemmung	circa 5 Minuten

Die Blutgruppenbestimmung auf der Tüpfelplatte dauert circa 5 Minuten.

VIII. Diskussion

VIII.1. Herstellung von ABO-Blutgruppen-Bestimmungssets

Ein Ziel dieser Arbeit war zu prüfen, ob ABO-Blutgruppen-Bestimmungssets "unter einfachen Bedingungen" herstellbar sind.

Dieses Ziel wurde eindeutig erreicht.

Für alle Arbeitsgänge wurden Geräte und Substanzen verwendet, welche den Anforderungen eines minimal ausgestatteten ländlichen Hospitals entsprechen:

- einfache, standardisierte Geräte
- kostengünstige Konservierungssubstanzen
- geringer Zeitaufwand in der Herstellung
- einfache Durchführung der Probenaufbereitung

Zur Gewinnung der Grundsubstanz, des menschlichen Blutes, ist das Vorhandensein eines geeigneten Spenderstammes nötig.

Für die Herstellung von Testseren erwiesen sich zufällig ausgewählte Spender als ausreichend. Die Proben wurden vom Diagnoselabor der Missionsärztlichen Klinik bezogen, so auch von alten und kranken Menschen.

Da Titerbestimmungen, wegen ihres technischen Aufwandes nicht überall durchführbar sind, wurde pro Serum einer Blutgruppe ein "Serumpool" à 3 Seren erstellt. Der gemessene, "gepoolte" Titer der 12 "Pools" lag ausreichend hoch. Der errechnete, "gepoolte" Titer der 12 "Pools" zeigte zum gemessenen, "gepoolten" Titer eine hohe Korrelation mit einer signifikanten Abhängigkeit der beiden Werte. Somit ist aufgezeigt, daß beim Mischen der Seren keine auffälligen Einbussen der Titerhöhe entstehen. Im Gegenteil können niedrige Titerwerte einiger Spender durch Pools ausgeglichen werden.

Die Herstellung von Testerythrozyten ist ebenfalls problemlos möglich. Die Haltbarkeit, bzw. die Verwendungsdauer findet jedoch Einschränkungen. Hierauf soll in Kapitel VIII.2. genauer eingegangen werden.

VIII.2. Tauglichkeit der Testsets im Hinblick auf Lagerung unter

tropischen

Ein zweites Ziel dieser Arbeit war die Tauglichkeitsprüfung von Testseren und Testerythrozyten im Hinblick auf die Lagerung unter tropischen Klimaverhältnissen. Da nicht in allen Hospitälern Kühlschränke vorhanden sind, wurden die Testsubstanzen sowohl unter nicht gekühlten als auch unter gekühlten Bedingungen gelagert.

Zudem sollte aufgezeigt werden, inwieweit sich der Titer der Testseren, bzw. die Agglutinabilität der Testerythrozyten im Laufe der Lagerungsdauer verändern.

VIII.2.1. Testseren

Dauer

4 Wochen Lagerung

Nach 4 Wochen zeigten die Testseren sowohl bei $+4^{\circ}\text{C}$, bei $+25^{\circ}\text{C}$, als auch bei $+37^{\circ}\text{C}$ einen signifikanten Titerabfall.

Alle 40 Proben wiesen, trotz des Titerabfalls, nach diesem Zeitraum eine noch gut sichtbare Agglutination auf.

Das heisst, daß im Zeitraum von 4 Wochen auch bei Temperaturen bis $+37^{\circ}\text{C}$ gelagert werden kann.

8 Wochen Lagerung

Nach 8 Wochen Lagerung wiesen mit Ausnahme einer Probe bei $+25^{\circ}\text{C}$ Lagerung noch alle Proben eine deutliche Agglutination auf.

Demzufolge wäre eine Lagerung über 8 Wochen bei $+25^{\circ}\text{C}$ nur noch eingeschränkt zu empfehlen.

Da jedoch, bei $+37^{\circ}\text{C}$ Lagerung bei allen Proben eine Agglutination nachweisbar war, ist anzunehmen, daß es sich bei obigem Ausreißer um eine Fehlmessung handelt.

14 Wochen Lagerung

Nach 14 Wochen wurde bei +4⁰C und +25⁰C Lagerungstemperatur bei allen Proben eine ausreichende Agglutination nachgewiesen.

Demzufolge ist eine Lagerung bei +4⁰C und +25⁰C über 14 Wochen noch gut möglich.

Bei +37⁰C Lagerungstemperatur wurde bei 13 von 40 Proben kein Agglutinationsnachweis mehr erbracht.

Bei dieser Temperatur ist eine Lagerung über 14 Wochen nicht mehr zu empfehlen.

Temperatur

Vergleicht man die Titerwerte nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen so lassen sich folgende Ergebnisse diskutieren:

Nach 4 Wochen Lagerungsdauer zeigt sich zwischen den verschiedenen Lagerungstemperaturen kein signifikanter Unterschied.

Demzufolge spielt bei Lagerungszeiten bis 4 Wochen eine Temperatur bis +37⁰C keine Rolle.

Nach 8 Wochen zeigt der Vergleich zwischen +4⁰C und +25⁰C Lagerungstemperatur keine signifikant verschiedenen Werte. Zwischen +4⁰C und +37⁰C Lagerungstemperatur, sowie zwischen +25⁰C und +37⁰C zeigte sich ein signifikanter Unterschied.

Nach 14 Wochen zeigte ebenfalls der Vergleich zwischen +4⁰C und +25⁰C keine signifikant verschiedenen Werte. Zwischen +4⁰C und +37⁰C, sowie zwischen +25⁰C und +37⁰C war ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

Es wird deutlich, dass mit steigender Temperatur und Dauer der Lagerung zunehmend ein signifikanter Unterschied zwischen den Titerstufen besteht.

Dies lässt sich dadurch erklären, daß unter nicht physiologischen Bedingungen die

Anzahl der Antikörper und somit die Agglutinationsfähigkeit beständig abnimmt. Native Proteine haben eine niedrige Konformationsstabilität. Denaturierung tritt ein, wenn das Gleichgewicht der schwachen nicht bindenden Kräfte, welche die native Konformation erhalten, gestört wird. (11)

VIII.2.2. Testerythrozyten

Die Testerythrozyten zeigten nach 15 Tagen Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ und bei $+25^{\circ}\text{C}$ Lagerungstemperatur eine signifikante Einbusse in der Agglutinabilität.

Bei $+4^{\circ}\text{C}$ Lagerung wurde in allen 30 Fällen jedoch noch eine deutliche Agglutination verzeichnet.

Bei $+25^{\circ}\text{C}$ Lagerung erbrachten 2 von 30 keine Agglutination mehr.

Nach 30 Tagen agglutinierte nach Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ eine Probe, und nach Lagerung bei $+25^{\circ}\text{C}$ zwei Proben nicht mehr.

Das Nachlassen der Agglutinationseigenschaften im Laufe der Zeit lässt sich durch das Hämolisieren der Erythrozyten unter nicht physiologischen Bedingungen erklären.

Vergleicht man die Agglutinabilität bei den verschiedenen Lagerungstemperaturen, so zeigt sich noch nach 15 Tagen ein signifikanter Unterschied, nach 30 Tagen jedoch nicht mehr. Denn nach 30 Tagen ist sowohl bei $+4^{\circ}\text{C}$ als auch bei $+25^{\circ}\text{C}$ die Agglutinationseigenschaft massiv abgesunken.

Demzufolge ist nur eine Lagerzeit von maximal 15 Tagen bei $+4^{\circ}\text{C}$ zu empfehlen.

Hier liegt nun eine Diskrepanz zwischen den Möglichkeiten der Verwendung von Testseren und Testerythrozyten vor.

Wenn nur einfachste Bedingungen ohne die Möglichkeit der Kühlung der Testsubstanzen bestehen, so ist eine komplette Blutgruppenbestimmung, mit Hilfe der selbst hergestellten Testerythrozyten, nicht zu gewährleisten. Unter diesen Extrembedingungen kann in Ausnahmefällen nur eine Austestung mit Testseren

erfolgen. Es ist zu betonen, daß dann keine regelrechte, vollständige Bestimmung gewährleistet wird.

Doch der Vergleich der Ergebnisse der Testseren mit handelsüblichen Präparaten (Testseren und Testerythrozyten) zeigte bei 100 Proben eine 100%-ige Übereinstimmung, was die Verlässlichkeit der alleinigen Bestimmung mit Seren in gewissem Ausmaß rechtfertigen könnte.

VIII.3. Belastbarkeit der Testseren mit Mikroorganismen

In der Praxis werden Testseren in unsteriler Umgebung und mit unsterilen Pipetten verwendet. Um die Qualität des Konservierungsmittels Natriumazid zu testen, wurden Ausstriche auf Nährmedien am Tage der Konservierung, nach 8 Wochen und nach 14 Wochen vorgenommen. Es zeigte sich auf allen Proben keinerlei Wachstum und damit ein gutes Ergebnis.

Da dieser Test jedoch unter relativ sauberen, aber unsterilen Bedingungen durchgeführt wurde, sollte eine verschärfte Kontamination mit 4 verschiedenen Keimen eine Extrembelastung simulieren. Betrachtet man den mittleren Titerabfall der 20 Proben mit je vier Keimen (=80 Proben) und vergleicht ihn mit dem mittleren Titerabfall unverkeimter Proben, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Demzufolge erstreckt sich die Qualität des verwendeten Konservierungsmittels Natriumazid auch auf Extrembelastungen.

VIII.4. Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit handelsüblichen

Prä

Für die Genauigkeitskontrolle der Testsubstanzen zur Blutgruppenbestimmung wurden bei 100 Blutproben eine Blutgruppenbestimmung mit den eigen hergestellten Sets mit Testseren Anti-A, Anti-B, Anti-AB sowie Testerythrozyten A, B und O durchgeführt.

Anschließend wurden die Proben von einem unabhängigen Diagnoselabors der Missionsärztlichen Klinik mit handelsüblichen Test-Sets nachgetestet.

In allen 100 Fällen stimmten die Ergebnisse überein.

Nach den exakten Vertrauensgrenzen für die Binominalverteilung heißt das mit 95%-iger Sicherheit 0 - 3,62 Falschbestimmungen, bzw. mit 99%-iger Sicherheit 0-5,16 Falschbestimmungen erfolgen könnten.

Was die Kosten anbelangt, so kann klar demonstriert werden, daß die in dieser Arbeit aufgezeigte Herstellung bei Weitem günstiger ist als jene handelsüblicher Präparate.

IX. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß diese Arbeit alle Fragestellungen beantworten konnte.

Klare Aussagen und Richtlinien konnten erbacht werden über die Herstellung, die Anwendung, die Haltbarkeit, die Anfälligkeit gegenüber Hitze und den Kontaminationsschutz der Testsubstanzen.

Zum Ersten konnte aufgezeigt werden, daß die Möglichkeit besteht ABO-Blutgruppen-Bestimmungssets unter „einfachen Bedingungen“, das heißt einfach, kostengünstig, schnell und mit allerorts vertretenen Blutspendern, herzustellen.

Zum Zweiten konnte die Tauglichkeit dieser Sets im Hinblick auf Lagerung unter tropischen Klimaverhältnissen bewiesen werden.

Das heißt:

Testseren sind bis **8 Wochen** bei bis zu **+37° C** haltbar, bzw. bis **14 Wochen** bei bis zu **+25°C**.

Testerythrozyten sind bis zu **15 Tage** bei **+4° C** haltbar.

Zum Dritten konnte die Belastbarkeit der Testseren mit Mikroorganismen unter entsprechender Konservierung aufgezeigt werden.

Sowohl unter unsterilen Arbeitsbedingungen, als auch unter Belastung mit vier repräsentativen Keimen konnte gezeigt werden, daß unter Konservierung mit Natriumazid keine signifikanten Einbussen in der Agglutinabilität auftreten.

Zum Vierten hielten die Testsets einer Genauigkeitskontrolle im Vergleich mit handelsüblichen Präparaten stand.

Die Testergebnisse deckten sich zu 100%.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, daß es möglich ist, unter Bedingungen, wie

wir sie in vielen nicht industrialisierten Ländern finden, eine qualitativ hochwertige Blutgruppenbestimmung mit einfachen Mitteln durchzuführen.

In solchen Länder, z.B. in Zimbabwe, ist die Versorgung von medizinischen Produkten zunehmend schwierig. Eine lokale Produktion ist oft die einzige Möglichkeit den Transfusionservice aufrecht und bezahlbar zu erhalten.

Ich hoffe diese Arbeit konnte ihren Beitrag dazu leisten.

X. ANHANG

1. Anleitung zur Produktion und Verwendung von Blutgruppenbestimmungssets für den Einsatz unter einfachen Bedingungen

1.1 Testseren

Material

- menschliches Vollblut der Blutgruppen A, B und O
- Natriumazid, reinst (kristallines Pulver)
- Physiologische Kolchsalzlösung
- 10 ml Monovette, bzw. Spritze und Kanüle
- Zentrifuge (elektrisch oder handbetrieben) ca.1000 U/min
- sterile verschließbare Glasbehälter (à 5 ml)
- saubere Glasbehälter (zum Ansetzen der Konservierungslösung)
- Pipetten zum Abpipettieren des Serums à 1 ml und à 10 µl
- Aqua destillata
- Waage (Genauigkeit mindestens 10 g)
- industrielle Testsets (nötig nur für die erste Herstellung)

Gewinnung

Ermittlung von **je drei** Spendern der Blutgruppen A, B und O. Bei der ersten Herstellung ist hierfür einmalig ein handelsübliches ABO-Set nötig.

Aufarbeitung

1. Entnahme des Blutes durch sterile Venenpunktion mit dicker Kanüle in eine 10 ml Spritze.
2. Entnommenes Blut in einem verschlossenen Gefäß über mehrere Stunden, möglichst gekühlt sedimentieren lassen.
3. Zentrifugieren des Blutes mit 1000 U/min.
4. Abpipettieren des Serumüberstandes
5. Inaktivierung, durch Zerstörung des Komplementes durch Lagerung über 3 Minuten

Konservierung

1. Herstellung der 10%-igen Stammlösung Natriumazid:
10 g NaN_3 mit 90 ml destilliertem Wasser in sauberem Gefäß vermischen bis zur Auflösung der NaN_3 -Kristalle.
2. Je 1 ml (1000 μl) Serum werden 10 μl 10%-ige NaN_3 -Lösung zugefügt und vorsichtig vermischt.
3. Aufbewahrung in verschließbaren (möglichst sterilen) Glasbehältern, bis zu 8 Wochen bei bis zu $+37^\circ\text{C}$ bzw. bis zu 14 Wochen bei bis zu $+25^\circ\text{C}$

1.2. Testerythrozyten

Material

- menschliches Vollblut der Blutgruppe A, B und O
- physiologische Kochsalzlösung
- Aqua destillata
- Natriumcitrat
- Formalin
- 10 ml-Monovette
- sterile verschließbare Glasbehälter (ca. 5ml)
- Pipetten à 1 ml und à 10 µl
- Waage (Genauigkeit mindestens 0,1g)
- industrielle Testsetes (nötig nur für die erste Herstellung)

Gewinnung

Ermittlung **je eines** Spenders der Blutgruppe A, B und O

Konservierung

1. Herstellung einer 3,8% Natriumcitratlösung:
3,8 g Natriumcitratpulver mit 96,2 g physiologischer Kochsalzlösung vermischen.
2. Herstellung einer 1% Formalinlösung:
3,3 ml Formalin (= 37% Formaldehyd) mit 97,7 ml physiologischer Kochsalzlösung vermischen.

3. Dem Vollblut 3,8% Natriumcitratlösung im Verhältnis 1:5 zufügen.
Beispiel: 2 ml Vollblut zu 0,4 ml Natriumcitratlösung.
4. Das Zitratblut im Verhältnis 7:1 mit 1% Formalin versehen.
Beispiel: 2,4 ml Zitratblut zu 0,343 ml 1% Formalin.
5. Aufbewahrung in verschließbaren Glasbehältern, bis zu 15 Tagen bei 4°C

Aufschwemmung

1. Waschen in physiologischer Kochsalzlösung :
 - Zu 1 ml Blut 9 ml physiologische Kochsalzlösung zufügen und vermischen
 - Zentrifugieren bei 1000U/min
 - Überstand abgießen
 - Vorgang einmal wiederholen
2. Herstellung der 4% Aufschwemmung:
 - Dem gewaschenen Blutkörperchensediment 0,1 ml entnehmen und mit 4,9 ml physiologischer Kochsalzlösung versehen.

Bemerkung: Die Aufschwemmung ist nur am Tage der Herstellung verwendbar.

2. Anmerkungen

Natriumazid –

Beschreibung, Eigenschaften, Darstellung, Anwendung und Warnhinweise

Summenformel: NaN_3

Molekülmasse: 65,01 g/mol

CAS-Nr.: [26628-22-8]

EWG-Nr.: 2478521

GGVE/GGVS: 6.1/42b

Beschreibung/Eigenschaften

Bei der Substanz handelt es sich um farblose Kristalle, die in Wasser und flüssigem Ammoniak löslich, dagegen in Ethanol kaum und in Diethylether unlöslich sind. In saurer Lösung zersetzt sich Natriumazid zu Stickstoffwasserstoffsäure (einer niedrig siedenden Flüssigkeit, Kp. 37°C); beim Erhitzen auf über 300°C zersetzt sich der Stoff ebenfalls:



Das Azid lässt sich allerdings unzersetzt schmelzen und verpufft erst beim stärkeren Erhitzen oder auf Schlag.

Die Dämpfe der Stickstoffwasserstoffsäure sind sehr giftig und verätzen die Schleimhäute. Die Stickstoffwasserstoffsäure ist äußerst explosiv unter spontanem Zerfall und Rückbildung von Stickstoff. Dasselbe gilt für Schwermetallazide wie $\text{Pb}(\text{N}_3)_2$, die technisch als Initialzündler in Patronenhülsen Verwendung finden.

Azide, also auch Natriumazid, hemmen spezifisch Enzyme, die Schwermetalle enthalten. Sie sind daher ausgesprochen toxisch. Das Azidion hat zudem einen stark

blutdrucksenkenden Effekt. Schon die Inhalation oder die orale Aufnahme kleiner Mengen (z.B. 1,5 ml 10%ige Lösung) hat starke Vergiftungserscheinungen zur Folge. Stickstoffwasserstoffsäure und ihre Lösungen riechen unerträglich stechend und rufen bei Exposition Schwindel, Kopfschmerz und Hautreizung hervor. Das präparative Arbeiten mit Natriumazid und Stickstoffwasserstoffsäure-lösungen darf nur im gut wirkenden Abzug unter Verwendung eines Schutzschildes erfolgen, Schutzbrille tragen! Die Versuchsvorschriften sind streng einzuhalten, niemals darf Stickstoffwasserstoffsäure aufkonzentriert werden (spontane Explosion möglich). Die Lösungen sind vor Gebrauch unbedingt zu titrieren.

Das Azid-Ion N_3^- ist ein sog. Pseudohalogenid. Es verhält sich in vielen Reaktionen wie Cl^- . Das mesomeriestabilisierte Ion ist linear und symmetrisch, mit einheitlichen Abständen zwischen den Stickstoffatomen (liegen zwischen denen der N-N-Doppel- und Dreifachbindungen). Diese Stabilisierung fehlt bei der freien Säure und den Schwermetallaziden

Darstellung

Natriumazid entsteht beim Überleiten von Distickstoffmonoxid (erhältlich z.B. aus Ammoniumnitrat durch vorsichtiges Erhitzen) über Natriumamid bei 180 °C:



In einem präparativ aufwendigeren Verfahren erhält man Natriumazid aus Natriumamid und Natriumnitrat in der Schmelze bei 175 °C. Daneben entstehen Natriumhydroxid und Ammoniak.

Warnhinweise

Die Substanz darf ausschließlich in erlaubter Weise, insbesondere zu wissenschaftlichen oder künstlerischen Forschungs-, Analysen-, Demonstrations- oder Schulungszwecken verwendet werden. Natriumazid darf NICHT zur Herstellung von Sprengstoffen oder von Stoffen, die dem Betäubungsmittelgesetz unterliegen, verwendet werden. Dieses Produkt darf KEINE Verwendung finden als Arzneimittel (seien es Human- oder Tierarzneimittel), Kosmetika, Lebens- oder Futtermittelzusatz, sowie Haushalts- und Agrochemikalie. Der Abnehmer muß sich in

Eigenverantwortung über die Gefahreigenschaften der vom Verkäufer bezogenen Gefahrstoffe informieren (vgl. Unterrichtung gem. § 3 ChemVerbotsV) und hat gegebenenfalls auch weitere Untersuchungen bzw. Nachforschungen durchzuführen, um sich mit allen Risiken, die beim Umgang mit solchen Produkten auftreten können, vertraut zu machen. Der Verkäufer ist nicht haftbar für irgendwelche im Zusammenhang mit Lagerung und Verwendung der bezogenen Stoffe entstandenen Schäden, Folgeschäden und mit diesen zusammenhängenden Schäden oder Verluste. (24)

XII. LITERATUR

- (1) Woodruft A.W.: Recent Work Concerning Anemia in the Tropics, Seminars in Hematology, Vol.19,No.2.,1982, p 141-146
- (2) Diesfeld, H.J.: Medizin in Entwicklungsländern. Handbuch zur praxisorientierten Vorbereitung für medizinische Entwicklungshelfer, 5. Aufl., Verlag Lang, Frankfurt / Main, 1989, ISBN 3-631-41691-1
- (3) Boorman K.E., Dodd B.E.: Blutgruppen-Serologie. Eine Einführung in ihre Theorie, Methodik und praktische Anwendung. Verlag Fischer, Stuttgart, 1964 p 20
- (4) Spielmann W., Kühnl P.: Blutgruppenkunde, 1.Aufl., Verlag Thieme, Stuttgart, 1982,
- (5) Wallheusser K.H.: Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie, Verfahren Wirkstoffe, Prüfungsmethoden, 2.Aufl., Verlag Thieme, 1967, p 611
- (6) Seidl S., Gilsenbach H.: Leitfaden der Blutgruppenserologie, Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1960, p 26
- (7) Brief der Firma Behring
- (8) Beipackzettel von Affirmagen der Firma Ortho-Diagnostik
- (9) K.E. Boorman, B.E.Dodd, 1964. Blutgruppenserologie. Eine Einführung in ihre Theorie, Methodik und praktische Anwendung. Verlag Fischer, Stuttgart, p 141
- (10) Dokumenta Geigy, wissenschaftliche Tabellen,7.Auflage p.98

- (11) Voet D., Voet J.G.: Lehrbuch der Biochemie, Verlag Wiley-VHC, Weinheim, 2002, p.174
- (12) WHO. The Clinical Use of Blood: Handbook, WHO Library Cataloguing-in-Publication.WHO/BTS/99.3 Genf 2001, p 79-82
- (13) WHO, Roy T.C.F., Nicholson G.S., Ala F.A.: Blood grouping reagents, Preparation and application methods, WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series, Alexandria 1993, p:15-20
- (14) Cheesbrough M. :District Laboratory Practice in Tropical Countries, Part 1, Cambridge University Press, Cambridge, 2000, p:1-117
- (15) Cheesbrough M. :District Laboratory Practice in Tropical Countries, Part 2, Cambridge University Press, Cambridge 2000, p:349-357
- (16) Gerard C., Sondag-Thull D., Watson-Williams E.J., Fransen L.: Safe Blood in Developing Countries, Principles and Organisation, Office for Official Publications of the European Communities, Brüssel, 1995, p:87/88
- (17) WHO, Hollan R., Wagstaff W., Leikola J.,Lothe F., Management of Blood Transfusion Service, WHO Library Cataloguing-in-Publication, ISBN 92 4 154406 6, Genf, 1990, p:66 ff
- (18) Gibbs W.N., Britten A.F.H.: Guidelines for the organization of a blood Transfusion Service, WHO Cataloguing in Publication Data, ISBN 92 4 154445 7, Genf, 1992, ,p 58-59
- (19) WHO: Safe Blood and Blood Products, Distance Learning Materials WHO Global Programme on AIDS, Module 3, 2003,p 16-34, WHO/GPA/CNP/93.2C
- (20) WHO: Manual of Basic Techniques for Health Laboratory, 2nd edition WHO

Library Cataloguing-in-Publication Data ,ISBN 92 4 154530 5, Genf 2003

(21) WHO: Guidelines for quality assurance programmes for blood Transfusion Service, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 1993

(22) R.W. Beal, M. Bontinck, L. Fransen: Safe Blood in Developing Countries, a Report of the EEC`S Expert meeting, Brüssel 1992

(23) Hallmann L.: Klinische Chemie und Mikroskopie, Verlag Thieme, Stuttgart, 1952

(24) www.omikron-online.de

(25) Haubitz I.: Statistik für Mediziner, Universität Würzburg, Rechenzentrum und Institut für Informatik, Medas, 1990

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Fleischer für die Überlassung dieses Themas und den Ansporn eine tropenmedizinische Arbeit mit praktischem Bezug zu erstellen.

Herrn Prof. Dr. Markus Böck danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. August Stich, der mich ermunterte die Arbeit zu vollenden und eine herzliche und konstruktive Betreuung übernahm.

Ebenso verdient Andreas Fabricius herzlichen Dank, der sich mit Elan der praxisorientierten Seite der Arbeit annahm.

Frau S. Heller-Meier (MTA) danke ich für die liebevolle Hilfe und Betreuung im Labor.

Martin Dreier und Thomas Müller danke ich für die engagierte persönliche Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für die menschliche und finanzielle Unterstützung, mit welcher mir mein Studium ermöglicht wurde.



Lebenslauf

geboren am 12.01.1964
in Würzburg

Schule

1970 – 1974	Grundschule in Veitshöchheim
1974 – 1983	Gymnasium in Würzburg
05 / 1983	Abitur

Studium

1983 – 1985	Studium der Geographie in Würzburg
1985 – 1992	Studium der Human-Medizin in Würzburg
05 / 1992	Staatsexamen

Titel

08 / 1994	Approbation als Aerztin
07 / 2000	Diplom in Mountain Medicine
01 / 2001	FMH Chirurgie

Bisherige Tätigkeiten

01 / 1993 – 12 / 1994	Meiringen, Schweiz: Assistenzärztin Chirurgie
02 / 1995 – 12 / 1996	Baden, Schweiz: Assistenzärztin Chirurgie
02 / 1997 – 05 / 1997	Wil, Schweiz: Assistenzärztin Chirurgie
06 / 1997 – 03 / 1998	Oberärztin i.V, Chirurgie
05 / 1998 – 04 / 1999	Honiara, Solomon Islands: surgical registrar
05 / 1999 – 12 / 1999	Olten, Schweiz: Assistenzärztin Chirurgie

01 / 2000 – 06 / 2002
seit 07 / 2002

Oberärztin i.V. Chirurgie
Oberärztin Chirurgie

Spezielle Interessen

Chirurgie in den Tropen

Berg- und Expeditionsmedizin

Publikation

Ch. Bittner, M. Zuber, L. Eisner. Akute Ischämie der Hand bei einem Drogenabhängigen nach akzidenteller intraarterieller Injektion.

Swiss Surg 2002; 8: 281-284

Sonstige Interessen

Familie (Tochter, geboren 2003 und Sohn geboren 2006)

Bergsport (Wandern, Klettern, Skitouren, Gleitschirmfliegen)

Reisen (fremde Kulturen und Natur auf Länder angepasste Weise erkunden)

Musik (Klavier, Akkordeon)

Literatur (zeitgenössische Autoren)