

Aus dem Laser-Forschungslabor der Universität München
Leitung: Prof. Dr. Ronald Sroka



BESTIMMUNG VON ZINK-PROTOPORPHYRIN IX MITTELS FASEROPTISCHER MESSTECHNIK

Nicht-invasive Eisenmangeldiagnostik
und ihre Bedeutung für regelmäßige Blutspender

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Anne Schliemann
aus Würzburg

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. hum. biol. Ronald Sroka

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Dr. phil. Erwin Strobel
Prof. Dr. med. Michael Vogeser
Prof. Dr. med. Andreas Humpe

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Christian Homann

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2022

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Vorausblick.....	1
1.2	Eisenmangelanämie als weitreichendes Gesundheitsproblem.....	2
1.3	Regelmäßige Blutspender als Hochrisikogruppe für Eisenmangel.....	3
1.4	Entwicklung des Blutprodukte-Bedarfs in Deutschland.....	5
1.5	Die Bedeutung von ZnPP für die Eisenmangeldiagnostik	9
1.6	Blutspendetermine des BRK.....	13
2	Methodik und Materialien	15
2.1	Durchführung der Studie im Rahmen der Blutspendetermine des BRK.....	15
2.2	Blutprobengewinnung	19
2.2.1	Kapilläre Blutentnahme	19
2.2.2	Venöse Blutentnahme.....	19
2.3	Faseroptische ZnPP-Bestimmung (LMU-LFL)	22
2.3.1	Technische Grundlage.....	22
2.3.2	Faseroptische Küvetten-Messung (LMU-LFL).....	26
2.3.3	Faseroptische Lippen-Messung (LMU-LFL)	29
2.3.4	Faseroptische Schlauch-Messung (LMU-LFL)	31
2.4	Follow-up Untersuchung.....	33
2.5	Statistik.....	33
2.5.1	Fallzahlplanung	33
2.5.2	Stichproben	35
2.5.3	Verteilungsanalyse	35

2.5.4	Statistische Tests	35
2.5.4.1	Zentrale Tendenz	35
2.5.4.2	Diagnostische Güte	36
2.5.4.3	Übereinstimmung der Messmethoden.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Studienpopulation	38
3.2	Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation	40
3.3	Zentrale Tendenz	46
3.3.1	Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) in Gegenüberstellung zu Hb (KUM Labor-Messung, venös).....	46
3.3.2	ZnPP (faseroptische Messungen, LMU-LFL) in Gegenüberstellung zu ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor).....	50
3.3.3	ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) in Gegenüberstellung zu ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor).....	53
3.4	Übereinstimmung der Messmethoden.....	55
3.4.1	Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) in Gegenüberstellung zu Hb (KUM Labor-Messung, venös).....	55
3.4.2	ZnPP (faseroptische Messungen, LMU-LFL) in Gegenüberstellung zu ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor).....	56
3.4.2.1	Faseroptische Küvetten-Messung (LMU-LFL)	57
3.4.2.2	Faseroptische Lippen-Messung (LMU-LFL)	58
3.4.2.3	Faseroptische Schlauch-Messung (LMU-LFL).....	60
3.4.3	ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) in Gegenüberstellung zur ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor).....	61
3.5	Diagnostische Güte	63
3.5.1	Hb-Messung	63
3.5.2	ZnPP-Bestimmung.....	64
3.6	Hb-Wert Follow-up (BRK POCT-Folgemesung, kapillär)	68

4	Diskussion.....	73
4.1	Studienpopulation.....	73
4.2	Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation	73
4.3	Zentrale Tendenz	76
4.3.1	Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) in Gegenüberstellung zu Hb (KUM Labor-Messung, venös)	76
4.4	Diagnostische Güte	81
4.4.1	Hb-Messung	81
4.4.2	ZnPP-Bestimmung	84
4.5	Hb-Wert Follow-up (BRK POCT-Folgemesung, kapillär)	95
4.6	Stärken und Schwächen der Studie	97
5	Zusammenfassung	103
	Literaturverzeichnis	109
	Anhang 1: Tabellen und Abbildungen der statistischen Planung...	116
	Anhang 2: Tabellen der deskriptiven Statistik.....	122
	Anhang 3: Tabellen der Bland-Altman-Analyse.....	124

Eidesstattliche Versicherung

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entwicklung des Blutprodukte-Bedarfs in Deutschland	8
Abb. 2: Skizze des faseroptischen Messgerätes.....	23
Abb. 3: Fluoreszenzspektrum der Blutprobe eines Studienteilnehmers	25
Abb. 4: Messaufbau der faseroptischen Küvetten-Messung.....	27
Abb. 5: ZnPP-Abfall bei anhaltender Laser-Belichtung der blutgefüllten Küvette (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL)	28
Abb. 6: Reduktion der ZnPP-Fluoreszenzintensität zwischen 1. und 100. Fluoreszenzspektrum (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL)	29
Abb. 7: Messaufbau und Applikation der faseroptischen Lippen-Messung (LMU-LFL).....	31
Abb. 8: Messaufbau der faseroptischen Schlauch-Messung (LMU-LFL)	32
Abb. 9: Studienstandorte.....	39
Abb. 10: Studienpopulation.....	39
Abb. 11: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Stadien.....	41
Abb. 12: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Stadien und ergänzender Labordiagnostik.....	42
Abb. 13: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Geschlecht	43
Abb. 14: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Alter, Frauen.....	45
Abb. 15: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Alter, Männer	46

Abb. 16: Differenz: Hb (KUM Labor-Messung, venös) – Hb (BRK POCT-Messung, kapillär), Box-Whisker-Plot	48
Abb. 17: Korrelation: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) zu Hb (KUM Labor-Messung, venös)	49
Abb. 18: Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) – ZnPP (übrige ZnPP-Messmethoden), Box-Whisker-Plot	51
Abb. 19: Korrelation: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) zu ZnPP (übrige ZnPP-Messmethoden)	52
Abb. 20: Übereinstimmung: Hb (KUM Labor-Messung, venös) und Hb (BRK POCT-Messung, kapillär), Bland-Altman-Plot	56
Abb. 21: Übereinstimmung: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) und ZnPP (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL), Bland-Altman-Plot.....	57
Abb. 22: Übereinstimmung: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) und ZnPP (faseroptische Lippen-Messung, LMU-LFL), Bland-Altman-Plot.....	58
Abb. 23: Übereinstimmung: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) und ZnPP (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL), Bland-Altman-Plot.....	60
Abb. 24: Übereinstimmung: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) und ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor), Bland-Altman-Plot.....	61
Abb. 25: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor), ROC-Analyse.....	66
Abb. 26: Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT-Folgemesung, kapillär), Box-Whisker-Plot.....	69
Abb. 27: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) aller Studienteilnehmer mit gesunkenen Hb-Werten im Follow-up (BRK POCT-Folgemesung, kapillär)	72
Abb. 28: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) aller Studienteilnehmer mit gestiegenen Hb-Werten im Follow-up (BRK POCT-Folgemesung, kapillär)	72

Abb. 29: Eisenmangel unter den zugelassenen Spendern nach Selektion mittels Hb	78
Abb. 30: Differenz: Hb (KUM Labor-Messung, venös) – Hb (BRK POCT-Messung, kapillär aus Fingerbeere), Box-Whisker-Plot	80
Abb. 31: Hb-Werte (BRK POCT-Messung, kapillär) unterteilt nach Punktionsort, Box-Whisker-Plot	80
Abb. 32: Spenders Selektion aufgrund von Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) und ZnPP (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL)	92
Abb. 33: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär), Verteilungsanalyse	116
Abb. 34: Hb (KUM Labor-Messung, venös), Verteilungsanalyse	116
Abb. 35: Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT-Folgemessung, kapillär), Verteilungsanalyse	118

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ein- und Ausschlusskriterien	16
Tab. 2: Erhobene Messwerte	17
Tab. 3: Studienablauf	18
Tab. 4: Materialien, kapilläre Blutentnahme	19
Tab. 5: Materialien, venöse Blutentnahme	21
Tab. 6: Analytik der venösen Blutproben	22
Tab. 7: Materialien, faseroptische Lippen-Messung (LMU-LFL)	31
Tab. 8: Materialien, faseroptische Schlauch-Messung (LMU-LFL)	33
Tab. 9: Stadieneinteilung des Eisenmangels	40
Tab. 10: Ergänzende Labordiagnostik derjenigen Studienteilnehmer, die initial keinem Eisenmangelstadium zuzuordnen waren	44
Tab. 11: Differenz: Hb (KUM Labor-Messung, venös) – Hb (BKR POCT-Messung, kapillär), Wilcoxon-Test	48
Tab. 12: Korrelation: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) zu Hb (KUM Labor-Messung, venös)	49
Tab. 13: Differenz: ZnPP (faseroptische Messungen, LMU-LFL) – ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor), Wilcoxon Test	50
Tab. 14: Korrelation: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) zu ZnPP (faseroptische Messungen, LMU-LFL)	51
Tab. 15: Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) – ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor), Wilcoxon- Test	54
Tab. 16: Korrelation, ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) zu ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor)	54
Tab. 17: Diagnostische Güte der Hb-Messmethoden	64
Tab. 18: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor), ROC-Analyse	66

Tab. 19: Diagnostische Güte der ZnPP-Messmethoden auf Grundlage errechneter Cutoffs.....	67
Tab. 20: Diagnostische Güte der ZnPP-Messmethoden auf Grundlage etablierter Cutoffs.....	68
Tab. 21: Korrelation: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) zu Hb (BRK POCT-Folgemessung, kapillär).....	70
Tab. 22: Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT-Folgemessung, kapillär), t-Test	70
Tab. 23: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) gruppiert nach gesunkenen/gestiegenen Hb-Werten im Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär), Mann-Whitney-U-Test	71
Tab. 24: Methodenvergleich Diagnostische Güte, Erkennung von Eisenmangelanämie	82
Tab. 25: Methodenvergleich Diagnostische Güte, Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie	83
Tab. 26: Hb-Werte, Verteilungsanalyse	117
Tab. 27: Hb-Differenzen, Verteilungsanalyse	117
Tab. 28: ZnPP-Werte, Verteilungsanalyse	118
Tab. 29: ZnPP-Differenzen, Verteilungsanalyse.....	119
Tab. 30: ZnPP (HPLC-Messung, Labor Volkmann) gruppiert nach gesunkenen/gestiegenen Hb-Werten im Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär), Verteilungsanalyse.....	120
Tab. 31: Übersicht der Wertepaar Differenzen unter Ausschluss der Ausreißer, Verteilungsanalyse	121
Tab. 32: Hb-Differenzen, Deskriptive Statistik.....	122
Tab. 33: ZnPP-Differenzen, Deskriptive Statistik	123
Tab. 34: Übereinstimmung Hb-Werte, Bland-Altman-Analyse.....	124
Tab. 35: Übereinstimmung ZnPP-Werte, Bland-Altman-Analyse	125

Abkürzungsverzeichnis

AUC.....	Area under the curve
Beta.....	Regressionskoeffizient Beta
BRK.....	Bayerisches Rotes Kreuz
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
EK.....	Erythrozytenkonzentrat
Hb.....	Hämoglobin
HPLC.....	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High performance liquid chromatography)
IDE.....	Eisendefizitäre Erythropoese (Iron deficient erythropoiesis)
KUM.....	Klinikum der Universität München
LFL.....	Laser-Forschungslabor (LMU)
LMU.....	Ludwig-Maximilians-Universität München
LoA.....	Übereinstimmungsgrenzen (Limits of agreement)
LR ⁻	Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis (Negative Likelihood Ratio)
LR ⁺	Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis (Positive Likelihood Ratio)
MFA.....	Medizinische Fachangestellte im Blutspendewesen
PDSB.....	Predonation Sampling Bag
POCT.....	Point-of-Care-Testing
ROC.....	Receiver Operating Characteristic
SD.....	Standardabweichung (Standard deviation)
sTfR.....	Löslicher Transferrinrezeptor (Soluble transferrin receptor)
WHO.....	World Health Organization
ZnPP.....	Zink-Protoporphyrin IX

1 Einleitung

1.1 Vorausblick

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Diagnostik von Eisenmangel unter Verwendung einer neuartigen Messmethode auseinander. Der gemessene Parameter Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP) fällt bei erschöpften Eisenspeichern vermehrt an und kann eine Beeinträchtigung der Erythropoese durch Eisenmangel sowie eine Eisenmangelanämie anzeigen. Die Quantifizierung des Moleküls ZnPP mittels faseroptischer Messtechnik wurde am Laser-Forschungslabor der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) entwickelt. Die faseroptische ZnPP-Bestimmung ermöglicht einen nicht-invasiven Einblick in den Eisenstoffwechsel des Patienten durch Aufsetzen eines Sensors auf die Unterlippe. Zur Prüfung des Verfahrens wurden im Rahmen dieser Arbeit 100 Probanden untersucht. Als Studienpopulation dienten dabei regelmäßige Blutspender der mobilen Blutspende des Blutspendedienstes des Bayerischen Roten Kreuz (BRK), da sie eine Hochrisikogruppe für Eisenmangel darstellen [1, 2]. Neben der ZnPP-Messung durch die Haut der Unterlippe wurde die faseroptische Methode so angepasst, dass eine Messung durch den Blutentnahmeschlauch während der Blutspende möglich wurde. Diese Methode kam in der vorliegenden Arbeit erstmals zum Einsatz. Als Referenz für die Beurteilung der Messergebnisse wurde ZnPP aus venösem Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Vollblut bestimmt. Dies erfolgte einerseits ebenfalls faseroptisch an pipettiertem Blut in einer Küvette und andererseits mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Darüber hinaus diente die Untersuchung des Blutserums der Einschätzung des Eisenstatus jedes Studienteilnehmers. Es wurden dafür etablierte diagnostische Biomarker wie Ferritin, Transferrin und löslicher Transferrinrezeptor (sTfR) herangezogen. Die Erkennung einer Eisenmangelanämie gelang in Ergänzung zu den genannten Parametern durch die Bestimmung des Hämoglobin (Hb)-Wertes. Dieser wurde aus venösem EDTA-Vollblut und im Rahmen der Blutspende aus kapillärem Vollblut bestimmt.

Ziel der Untersuchungen war die Feststellung der Prävalenz von Eisenmangel in der Studienpopulation, die Evaluation der derzeitigen Spenderselektion mittels kapillärer Hb-Bestimmung und die umfassende Prüfung der diagnostischen Güte der innovativen faseroptischen Messtechnik. Zur eingehenden Beurteilung der Ergebnisse diente ein Methodenvergleich, bei dem die kapilläre und venöse Hb-Wert-Bestimmung einander gegenübergestellt wurden. Ebenso erfolgte ein Vergleich zwischen faseroptischen ZnPP-Messungen und ZnPP-Messung mittels HPLC-Referenz. Durch eine HPLC-Wiederholungsmessung wurde die Verlässlichkeit der Referenz für die ZnPP-Messungen geprüft.

Zusätzlich zu den genannten vergleichenden Betrachtungen konnten die angewandten diagnostischen Verfahren durch Berechnung von Sensitivität, Spezifität und Likelihood Ratio aus Kontingenztafeln und sich anschließender Receiver Operating Characteristic (ROC) bewertet werden. Eine Follow-up Untersuchung der kapillären Hb-Werte der Blutspender ermöglichte darüber hinaus die Überprüfung des Vorhersagewertes der erfolgten ZnPP-Messungen.

Mithilfe der Auswertungen sollte schließlich die Anwendbarkeit der faseroptischen Messungen beim Blutspendedienst und der Wert der innovativen Messtechnik für regelmäßige Blutspender beurteilt werden.

Die nachfolgende einleitende Betrachtung der motivierenden Hintergründe dient der Einschätzung der Relevanz über die Studienpopulation hinaus.

1.2 Eisenmangelanämie als weitreichendes Gesundheitsproblem

Anämien stellen eine ubiquitär relevante Erkrankung dar. Aus den Daten der Global Burden of Diseases Study 2010 geht hervor, dass die Prävalenz für diese Erkrankung 2010 bei 32,9% der Weltbevölkerung lag [3]. 50% der Anämien weltweit konnten 2011 auf Eisenmangel zurückgeführt werden. Obwohl die Krankheitslast für Eisenmangelanämien in Entwicklungsländern höher ist, wurden auch in deutschen Krankenhäusern 2016 bei vollstationären Patienten

42.812 Fälle von Eisenmangelanämie identifiziert [4]. 2011 litten in Deutschland knapp 10% der Frauen im Alter zwischen 15 und 49 Jahren an dieser Mangelkrankung [5].

Hinsichtlich dieser Zahlen, spricht sich die WHO für die Dringlichkeit der Prävention und Kontrolle von Anämien aus. 2014 nahm sie die Reduktion von Anämien bei Frauen im gebärfähigen Alter in die Liste der fünf globalen Nutrition Targets 2025 auf. Politischen Entscheidungsträgern wird zur Verfolgung dieses Ziels die Verbesserung der Erkennung und Messung von Anämien empfohlen [6].

Dieser Strategie dienend, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Feststellung von Eisenmangel unter Anwendung unterschiedlicher diagnostischer Methoden. Damit unterstützt sie den Fortschritt der Früherkennung der ätiologisch bedeutsamsten Anämieform.

1.3 Regelmäßige Blutspender als Hochrisikogruppe für Eisenmangel

Prävention und Kontrolle von Erkrankungen erfordern eine gezielte Auswahl der untersuchten Population, um den Nutzen eines Screenings zu erhöhen. Die Number Needed to Screen sinkt mit steigender Prävalenz des gesuchten Merkmals [7]. Die Wahrscheinlichkeit von einer Früherkennungsmaßnahme zu profitieren ist für den Einzelnen in einer Hochrisikogruppe deutlich erhöht.

Diesem Gedanken folgend, wurden für die vorliegende Studie regelmäßige Blutspender selektiert. Diese unterliegen einem erhöhten Risiko für Eisenmangel [1, 2] und stellen daher eine geeignete Population dar, um die Prävalenz der Eisenmangelanämie durch verbesserte Diagnostik zu senken.

Bei der Untersuchung von 2425 regelmäßigen Blutspendern in den USA war die Krankheitshäufigkeit für Eisenmangel bei 4-6 Spenden innerhalb von zwei Jahren beachtlich. So wiesen 28% der untersuchten Spender eine Erschöpfung der Eisenspeicher (Ferritin <12 ng/ml) auf. 59% zeigten bereits eine mangelbedingte Beeinträchtigung der

Erythropoese ($\log(sTfR/\text{Ferritin}) > 2.07$) an [1]. Bei einer Studie aus dem Iran an gesunden Männern ($n=235$) hatten drei Spenden im Laufe eines Jahres in 20% der Fälle eine Eisenmangelanämie zur Folge [8]. In Abhängigkeit von Geschlecht und gewählter Diagnostik zeigte sich auch bei regelmäßigen Spendern aus Dänemark ($n=5280$) eine Eisenmangelprävalenz von bis zu 27,4%. Der höchste Wert wurde dabei bei Männern unter Betrachtung der Hcpidinkonzentration erfasst [2].

Regelmäßigen Blutspendern drohen vor allem unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit, Konzentrationsschwäche oder Kurzatmigkeit. Die rein klinische Diagnosestellung eines Eisenmangels ist daher nicht zuverlässig leistbar. Durch apparative Testung des Hb-Wertes jedes Blutspenders vor der Spende werden Blutentnahmen an der Grenze zur Anämie verhindert. Da sich ein Eisenmangel jedoch bereits vor dem Erreichen kritischer Hb-Werte klinisch manifestiert, könnten Blutspender von der Erkennung früher Stadien profitieren.

Über den persönlichen gesundheitlichen Nutzen für den Spender hinaus, ist die Verhütung von Eisenmangelanämien auch zur Gewährleistung der Bereitstellung von Blutprodukten für die Bevölkerung von Bedeutung. Nur 21% der Erythrozytenkonzentrate (EK) stammten 2006 aus Erstspenden [9], sodass vor allem regelmäßige Blutspender die Versorgung Transfusionsbedürftiger gewährleisteten. Für die Gesundheitspolitik besonders wertvolle Spender unterliegen somit einem gesteigerten Risiko eine Eisenmangelanämie zu erleiden und von einer weiteren Blutspende abgelehnt zu werden. Berücksichtigt man die Beobachtung, dass eine Zurückweisung von der Blutspende die Wahrscheinlichkeit erneut zu spenden reduziert [10], so stellt die Prävention von Eisenmangel bei regelmäßigen Blutspendern ein wichtiges Instrument zum Erhalt ausreichender Blutspendenzahlen dar.

1.4 Entwicklung des Blutprodukte-Bedarfs in Deutschland

Eine hohe Blutspendebereitschaft ist vordringlich für die Bereitstellung ausreichender Erythrozytenkonzentrate (EK) von Bedeutung. 2016 machten EK in Deutschland mit knapp 74% den Hauptteil der Transfusionen aus Fremdspenden aus [9]. Im Folgenden stehen die Daten zu Gewinnung und Verbrauch von EK daher stellvertretend für die Entwicklungen im Bereich der Transfusionsmedizin.

Wer sich in den vergangenen Jahren mit wissenschaftlichen Erkenntnissen auf dem Gebiet der EK-Therapie auseinandergesetzt hat, weiß um den negativen Trend im Einsatz dieser Blutprodukte. Ein Einblick in die Umstände dieses Wandels soll erklären, warum die eingeschränkte Verwendung von EK nicht mit einem Rückgang des Bedarfs gleichzusetzen ist und warum die Bindung regelmäßiger Blutspender weiterhin von Bedeutung ist.

Die klinische Forschung zur Transfusion von EK hat seit Beginn des 21. Jahrhunderts gezeigt, dass der restriktive Einsatz allogener Blutkonserven der liberalen Therapie mit EK in vielen Fällen gleichwertig bis überlegen ist [11-15]. Die historische, liberale 10/30-Regelung [16] sah EK-Transfusionen bei Hb-Werten unter 10 g/dl und einem Hämatokrit von unter 30% vor. Diese Regelung wurde bis 2014 von differenzierteren Empfehlungen unter Einbezug der klinischen Präsentation des Patienten abgelöst, wie der Entwicklung der Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten der Bundesärztekammer zu entnehmen ist [17, 18].

Im Jahr 2003 [17] lagen die empfohlenen Transfusionstrigger für organegesunde, belastbare Patienten bereits bei Hb-Werten von unter 6-7 g/dl und einem Hämatokrit von unter 20%. Auf die Notwendigkeit der Anpassung der Grenzwerte nach klinischer Beurteilung des Einzelfalles wurde lediglich hingewiesen. Die 4. überarbeitete und aktualisierte Auflage der Leitlinie von 2014 [18] beschäftigte sich präziser mit der Indikationsstellung einer EK-Transfusion unter individueller Berücksichtigung des Hb-Wertes, der

Kompensationsfähigkeit und der Risikofaktoren des Patienten. Die Empfehlung, eine Transfusion einzuleiten wurde ab 2014 für Patienten mit adäquater Kompensation und fehlenden Risikofaktoren nur noch bei Hb-Werten von unter 6 g/dl ausgesprochen. 2020 folgte mit der erneuten Aktualisierung der Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten der Bundesärztekammer eine weitere Differenzierung der Indikationsstellung. Ein Augenmerk wurde hierbei auf Kriterien für die Erkennung einer manifesten anämischen Hypoxie gelegt, der die EK-Transfusion entgegenwirken soll. In Abhängigkeit von klinischem Zustand, Anämieursache und Vorerkrankungen des Patienten wurden zudem verschiedene, angepasste Grenzwerte festgesetzt. Als absolute Indikation für eine EK-Transfusion wird ein Hämatokrit von etwa 15% bei Hb-Werten von 5,0 bis 4,5 g/dl genannt [19].

Grund für diese Neuerung war offenbar die fehlende Evidenz sowohl für den Vorteil liberaler Transfusionen als auch für den Nachteil restriktiver Transfusionen. So konnte beispielsweise beobachtet werden, dass orthopädische Patienten nach intraoperativem Blutverlust nicht vom liberalen Transfusionseinsatz profitieren [12]. Neurochirurgische Patienten zeigten weder gehäuft Komplikationen, noch gesteigerte Mortalität infolge restriktiver Therapie mit EK [11] und eine Metaanalyse zum Thema Transfusionsschwelle ergab keine Erhöhung der Krankenhausverweildauer in Zusammenhang mit restriktiven Transfusionen [15].

Über das Ausbleiben negativer Folgen durch restriktiven EK-Einsatz hinaus, konnten weitere Studien zum Thema nachweisen, dass transfusionsassoziierte Komplikationen durch den zurückhaltenden Einsatz von Blutprodukten reduziert werden. So ergab eine retrospektive Analyse zu Transfusionen bei Schädel-Hirn-Trauma-Patienten (n=1565), dass die Fieberdauer unter Anwendung zurückhaltenden Transfusionen zurückging [14]. Bei Patienten mit oberer gastrointestinaler Blutung konnten restriktive Transfusionen das 45-Tages-Überleben signifikant verbessern [13] und Carson et al. konnten 2012 in ihrer Metaanalyse zum Vergleich der beiden Transfusionsstrategien an 6264 Fällen zeigen, dass limitierte Transfusionen zu einem signifikanten Abfall der

Krankenhausmortalität führen [15]. Die Frage nach der Ursache dieses Outcomes wurde durch die genannten Studien nicht abschließend beantwortet. Mögliche Faktoren können allerdings die signifikant reduzierte Anzahl an postoperativen Infektionen [15] und das seltenere Auftreten thrombotischer Komplikationen [13] sein.

Neben direkten Auswirkungen auf behandelte Patienten, liegt ein weiterer Vorteil im ökonomischen Nutzen der Einsparung von Blutprodukten. Zudem begünstigt der Rückgang ungerechtfertigter Bluttransfusionen die Sicherstellung der Versorgung derjenigen, die eine Transfusion nicht entbehren können.

Durch die genannten Erkenntnisse wäre zunächst ein Einbruch des EK-Bedarfs zu erwarten. Aus Berichten des Paul-Ehrlich-Instituts zur Meldung nach § 21 Transfusionsgesetz geht jedoch hervor, dass der Bedarf an Erythrozytenkonzentraten zwischen 2001 und 2011 um 35% gestiegen ist, bei Spendenzunahme um lediglich 9% [9].

Eine Erklärung dafür kann die steigende Anzahl an Operationen bis 2010 liefern. So liest sich aus Daten des Robert-Koch-Instituts und des Statistischen Bundesamtes, dass der Anteil operierter Patienten an der Gesamtzahl vollstationärer Krankenhauspatienten zwischen 2005 und 2010 um 23% gewachsen ist [20]. Es werden zunehmend ältere Patienten operiert, sodass die am häufigsten operierte Altersgruppe 2005 noch 65-70-Jährige und 2011 70-75-Jährige waren. Die operativen Komplikationen, sowie Risikofaktoren, die für die Indikationsstellung einer Transfusion hinzugezogen werden, steigen mit zunehmendem Alter. Dadurch kann der Altersanstieg auch die Zunahme der Bluttransfusionen begründen.

Bis zum Jahr 2010 zeichnete sich entsprechend Abbildung 1 eine Tendenz ab, die einen drohenden Versorgungsengpass vorhersagte. Um diesen zu verhindern, wurde eine Veränderung hin zu höheren Spenderzahlen oder geringerem Blutproduktebedarf dringlich. Letzterer stellte sich ab 2012 ein. Vermutlich ermöglicht durch den verlangsamten Anstieg der Operationszahlen ab 2011 [20] und die weitere Zunahme restriktiver Empfehlungen. Den parallelen Rückgang der Spendebereitschaft in der Bevölkerung führt das BRK auf den

demographischen Wandel sowie die anhaltende Urbanisierung zurück. Die Anzahl spendefähiger Bürger sinkt durch die alternde Bevölkerung. Zudem hat sich gezeigt, dass die Spendebereitschaft in den zunehmend bevölkerten Ballungsräumen niedriger ist [21, 22]. Trotz der jüngsten Bewegungen seit 2012 sollte man nicht übersehen, dass der Bedarf an EK zwischen 2001 und 2016 um insgesamt 9% gestiegen ist. Demgegenüber ist seit 2001 ein Spenderückgang um 12% zu verzeichnen [9].

Medizinischer Fortschritt und Demographie schließen eine wiederkehrende Entwicklung zu komplikationsreicheren Interventionen und höherem Operationsalter nicht aus, sodass die zukünftigen Fluktuationen abzuwarten sind. In jedem Fall bleibt die Bereitstellung von EK für Patienten mit anämischer Hypoxie, hämorrhagischem Schock oder symptomatischer Sichelzellanämie lebensrettend.

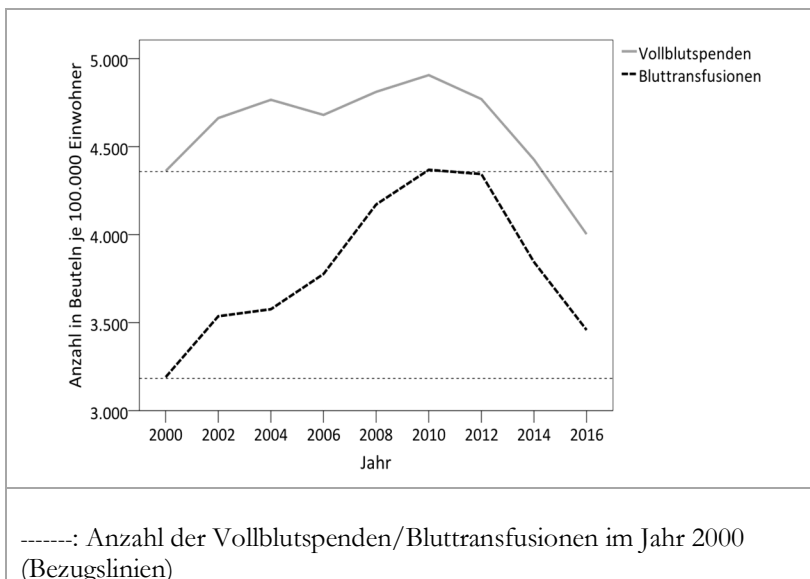


Abb. 1: Entwicklung des Blutprodukte-Bedarfs in Deutschland
Eigene Darstellung basierend auf [9]

Im Jahr 2016 wurden in Deutschland je 100.000 Einwohnern 3458 EK aus Fremdspenden transfundiert [9]. Solange in Deutschland kein standardisierter Einsatz künstlicher Sauerstoffträger als mögliche Alternative zu EK-Transfusionen erfolgt [23], muss die Spendebereitschaft der Bevölkerung bewahrt werden. Die Gesunderhaltung der Spender ist daher von großem medizinischen Interesse. Die Reduktion von Anämien durch frühe Diagnostik eines bestehenden Eisenmangels stellt dabei ein wichtiges Mittel dar.

1.5 Die Bedeutung von ZnPP für die Eisenmangeldiagnostik

Die Ergebnisse einer Untersuchung zur Ermittlung von Eisenmangel sind stark davon abhängig, welcher Parameter betrachtet wird. Bei der Untersuchung von dänischen Vollblutspendern ($n=5280$) fiel beispielsweise auf, dass sich die Prävalenz von subklinischem Eisenmangel bei der Betrachtung von Transferrinsättigung und Hcpidinkonzentration bei Männern um 22,6%-Punkte unterschied. So wies die Transferrinsättigung bei nur 4,8% der Untersuchten auf den Mangel hin, wohingegen die Hcpidinkonzentration bei 27,4% auffällig war [2]. Die Ursache dafür liegt darin, dass diese Parameter verschiedene Stadien des Eisenmangels anzeigen. Die Frage nach einem Eisenmangel sollte daher nie lediglich binär beantwortet werden. Nur eine differenzierte Einteilung kann dem fließenden Übergang von latentem Eisenmangel bei reduziertem Speichereisen über das Stadium der eisendefizitären Erythropoese (IDE) bis hin zur manifesten Eisenmangelanämie gerecht werden [24].

Erstlinien-Parameter zur Beurteilung des Eisenstatus ist das Serumferritin. Werte unter $15 \mu\text{g/l}$ bei weiblichen Personen ab 14 Jahren und unter $30 \mu\text{g/l}$ bei männlichen Personen ab 14 Jahren zeigen eine Reduktion des Speichereisens an (Referenzwerte des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München (KUM) [25]). Verschiedene medizinische Konditionen können allerdings ein abgefallenes Speichereisen maskieren, da entzündliche Erkrankungen, Leberzellschäden oder Tumorerkrankungen häufig zu einer Ferritinerhöhung führen. Somit setzt die verlässliche Interpretation des Serumferritins die Kenntnis des

Gesundheitszustandes des Patienten voraus. Zu beachten ist zudem, dass ein reduzierter Ferritinwert keinen Rückschluss auf die Beeinträchtigung der Erythropoese durch den bestehenden Eisenmangel zulässt. Erst in Zusammenschau mit dem Hb-Wert ist eine Abgrenzung zwischen Eisenmangel und Eisenmangelanämie möglich. Unterhalb von 12 g/dl bei weiblichen Personen und unter 13 g/dl bei männlichen Personen liegt bei einem Alter von über 14 Jahren eine Anämie vor (Referenzwerte des Instituts für Laboratoriumsmedizin des KUM [25]). Ungeklärt bleibt bei Betrachtung des Serumferritin- und Hämoglobin-Wertes jedoch weiterhin, inwieweit die Erythropoese bereits unter dem Eisenmangel leidet bevor eine Anämie eintritt.

In Ergänzung zu Ferritin und Hb wird für die Detektion eines funktionellen Eisenmangels daher der Einbezug des löslichen Transferrinrezeptors (sTfR) empfohlen [24]. Bei Eisenmangel exprimieren erythropoetische Vorläuferzellen vermehrt Transferrinrezeptoren, um die eigene Eisenversorgung durch die vermehrte Bindung des eisenbeladenen Glykoproteins Transferrin zu optimieren. Die Transferrinrezeptoren lösen sich in regelmäßigen Abständen von den Zellmembranen und können dann als lösliche Rezeptoren nachgewiesen werden. Die sTfR-Konzentration steigt bei Bestimmung mittels Dade-Behring Assay auf über 1,760 mg/l an (Referenzwerte des Instituts für Laboratoriumsmedizin des KUM [25]). Dies geschieht bei eisendefizitärer Erythropoese noch bevor die Transferrinsättigung oder der Hb-Wert absinken. Bei hämolytischer Anämie ist dieser Parameter kritisch zu betrachten, da durch die Zellyse vermehrt Transferrinrezeptoren in Lösung gebracht werden.

In Ergänzung zur Hb-Bestimmung stellen sTfR und Serumferritin geeignete Parameter dar, um frühe Stadien eines Eisenmangels zu erkennen. In Bezug auf regelmäßige Blutspender könnte die Erhebung dieser Messwerte durch die Ermöglichung der frühen Intervention zum Erhalt der Spendeignung und -bereitschaft beitragen. Allerdings gibt es derzeit für beide Verfahren kein Point-of-Care-Testing (POCT). Für die Beurteilung des Eisenstatus vor der Blutspende ist eine sofortige Verfügbarkeit der Messwerte jedoch unabdingbar.

Zur Lösung dieses Konfliktes kommt Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP) eine besondere Bedeutung zu. Ähnlich wie sTfR ist es Anzeiger für einen funktionellen Eisenmangel und ermöglicht in Zusammenschau mit dem Hb-Wert eine Stadieneinteilung des Eisenmangels. Das Molekül entsteht durch die Reaktion von Protoporphyrin IX mit einem zweiwertigen Zink-Ion. Protoporphyrin IX ist eine organische Verbindung, die als Grundgerüst an der Bildung der Häm-Gruppe des Hämoglobins beteiligt ist. Sie besteht aus vier Pyrrolringen mit acht Seitenketten. Die römische Ziffer IX bezeichnet die Art der Anordnung der funktionellen Atomgruppen innerhalb des Moleküls. Im eisensuffizienten Organismus findet eine Reaktion zwischen Protoporphyrin IX und Zink-Ionen nur geringfügig statt. Protoporphyrin IX wird, solange Eisen verfügbar ist, unter Katalysierung durch Ferrochelatase mit zweiwertigem Eisen beladen, sodass Häm entsteht. Durch Bindung des Häm-Moleküls an eine Globinkette entsteht eine Untereinheit des Hämoglobins. Vier dieser Untereinheiten bilden schließlich das Hämoglobin-Molekül, dessen vier Eisen-Ionen jeweils ein Sauerstoffmolekül binden können. Mit fortschreitendem Eisenmangel fehlt das Eisen zunehmend als Reaktionspartner für die Ferrochelatase. Das Enzym ist jedoch auch zur Reaktion mit Zink-Ionen befähigt. Bei reduzierter Verfügbarkeit von Eisen bilden damit anstelle von Eisen-Ionen zunehmend Zink-Ionen das Zentrum der Häm-Moleküle. Es fällt vermehrt ZnPP an. Der Quotient aus ZnPP und Häm steigt [26]. Die Erythropoese beginnt damit bereits unter dem Eisenmangel zu leiden bevor ein Hb-Abfall sichtbar wird. Unterhalb von 40 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ kann eine Beeinträchtigung ausgeschlossen werden. Werte über 50 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ zeigen eine Hinderung der Erythropoese an (Referenzwerte des MVZ Labors PD Dr. Volkmann und Kollegen GbR) [27]. Bei anhaltendem Eisenmangel kommt es schließlich zu einer Insuffizienz der Erythropoese mit Hb-Wert-Abfall. Der Cutoff für die Diagnose eines klinisch manifesten Eisenmangels liegt bei 80 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ [27]. Als etablierte Verfahren stehen für die Bestimmung des ZnPP-Wertes bisher zwei Verfahren zur Verfügung. Die Hersteller Aviv Associates Inc. (Lakewood, NJ, USA) und Helena Laboratories (Beaumont, TX, USA) ermöglichen die invasive Messung durch Hämatofluorometrie. Problematisch ist hierbei die Entstehung von

Messungengenauigkeiten durch interferierende Substanzen und mangelnde Hb-Oxygenierung, wodurch ein Waschen der Zellen oder der Einsatz zusätzlicher Reagenzien nötig wird [28]. Weiterhin steht aus dem klinischen Routineeinsatz eine ebenfalls invasive und kostenintensive HPLC-Messung ([29], GOÄ 4125) zur Verfügung, die nicht als POCT möglich ist. Im Rahmen der vorliegenden Studie kam demgegenüber eine innovative Messtechnik zum Einsatz, die den ZnPP-Wert unmittelbar und nicht-invasiv zugänglich macht [29]. In Bezug auf regelmäßige Blutspender wäre damit eine Erkennung von Eisenstoffwechselstörung in frühen Stadien vor Ort denkbar. Die durch das Laser-Forschungslabor der LMU entwickelte faseroptische Messung erlaubt die Quantifizierung von ZnPP im Kapillarblut mittels Sensor ohne Verletzung der Körperoberfläche. Eine Studie zur Testung der nicht-invasiven Messung durch die Haut der Unterlippe bei Frauen post partum (n=56) konnte mit einer Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 90% für die Erkennung von Eisenmangel überzeugen [29]. Definiert wurde Eisenmangel dabei durch das Vorliegen eines mittels HPLC ermittelten, erhöhten ZnPP-Wertes. Eine weitere Untersuchung der nicht-invasiven Messtechnik im Bereich der Pädiatrie an hospitalisierten Probanden im Alter von 9 Monaten bis 5 Jahren (n=99) erbrachte eine Sensitivität von 67% bei einer Spezifität von 97% [30] für die Erkennung von Eisenmangel. Dieser wurde dabei durch die Erhöhung des sTfR-Wertes definiert. Die vorliegende Studie soll die diagnostische Güte von ZnPP anhand einer weiteren Studienpopulation untersuchen und die Anwendbarkeit der nicht-invasiven Messung beim Blutspendedienst beurteilen. Erstmals kam dabei eine Methode zum Einsatz, die eine faseroptische Bestimmung des ZnPP-Wertes unmittelbar während der Blutspende möglich macht. Der bereits bewährte Messaufbau für die ZnPP-Bestimmung an der Unterlippe wurde dafür an die Messung am venösen Vollblut durch den Blutentnahmeschlauch angepasst.

1.6 Blutspendetermine des BRK

Die Untersuchung regelmäßiger Spender fand im Rahmen der mobilen Blutspende des BRK statt. Zum besseren Verständnis der nachstehenden Studienschilderung ist es von Vorteil, mit dem Verfahren der mobilen Blutspende beim BRK vertraut zu sein. Der Ablauf orientiert sich dabei maßgeblich an der Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten der Bundesärztekammer aus dem Jahr 2017 [31]. Das beschriebene Procedere spiegelt die Regelung zum Studienzeitpunkt wider und kann darüber hinaus variieren.

Als Blutspendelokale der mobilen Blutspende dienen öffentliche Gebäude oder Geschäftsstellen des BRK. Die Vorbereitungen für die Spende werden im Blutspendelokal unter standardisierten Bedingungen am Spendetag getroffen. Dabei werden ausschließlich durch das BRK gelieferte Materialien verwendet. Bei einem Blutspendetermin durchlaufen die Spender fünf Stationen, wobei sie sich mithilfe nummerierter Hinweisschilder im Blutspendelokal orientieren. Zu Beginn erfolgt die Anmeldung durch Aufnahme der persönlichen Daten sowie die Identifikation mittels Blutspendenausweis und amtlichem Lichtbildausweis. Durch Ausfüllen eines medizinischen Fragebogens erlauben die potentiellen Spender die Prüfung der gesetzlich vorgeschriebenen Ausschlusskriterien. Im anschließenden ärztlichen Gespräch findet neben dem Ausschluss von Kontraindikationen und der Feststellung der Eignung die Messung von Blutdruck, Puls und Körpertemperatur statt. Erfolgt eine vorläufige Zulassung durch den Arzt, begibt sich der Spender zur routinemäßigen Hb-Testung. Der Hb-Wert im Kapillarblut wird nach einem Lanzettenstich in das Ohrläppchen oder die Fingerbeere durch ein POCT-Gerät bestimmt. An diesem Punkt muss die definitive Zulassung erfolgen, damit eine Spende stattfinden darf. Die Annahme weiblicher Spender setzt einen kapillären Hb-Wert von 12,5 g/dl oder höher voraus. Bei männlichen Spendern liegt der Grenzwert bei 13,5 g/dl. Bei ausreichend hohem Wert wird die Blutspende durch venöse Punktion in der Ellenbeuge begonnen. Das verwendete Blutentnahmesystem zur Sammlung von Vollblut und Lagerung der gewonnenen Blutkomponenten verbindet die Punktionskanüle über ein

Schlauchsystem mit den auf einer Blutmischwaage gelagerten Blutbeuteln. Der Punktionskanüle ist ein Predonation Sampling Bag (PDSB) nachgeschaltet, der vor der Füllung des eigentlichen Spendebeutels über den Blutentnahmeschlauch befüllt wird. Er dient der routinemäßigen Gewinnung von Proben aus dem zu spendenden Blut. Nach der Blutentnahme aus dem PDSB wird der Blutfluss in den Spendebeutel freigegeben. Die Blutspende ist beendet, wenn die Blutmischwaage die Füllung mit 500 ml Vollblut signalisiert.

Im beschriebenen Ablauf der Blutspende des BRK ist die Hb-Testung das einzige Mittel zur Selektion von Spendern mit Eisenmangel. Da der Hb-Wert erst bei bereits bestehender Eisenmangelanämie absinkt, werden durch die Hb-Bestimmung nur Spender mit fortgeschrittenem Eisenmangel abgelehnt. Spender mit lediglich erschöpften Eisenspeichern oder eisendefizitärer Erythropoese dürfen weiterhin spenden. Dies führt bei den Betroffenen zu einer weiteren Beanspruchung der Eisenspeicher mit der Gefahr einer Progredienz des bestehenden Eisenmangels. Da bisher die Möglichkeit zur Diagnose niedriger Eisenmangelstadien vor Ort fehlt, um diesem Effekt entgegenzuwirken, ist es das Ziel der vorliegenden Untersuchung, diese Lücke mit einem raschen und einfachen POCT-Verfahren zu schliessen. Künftig sollen Spender mit geringer ausgeprägtem Eisenmangel dadurch vor klinischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Konzentrationsschwierigkeiten bis hin zu depressiver Symptomatik und Atemnot geschützt werden.

2 Methodik und Materialien

2.1 Durchführung der Studie

im Rahmen der Blutspendetermine des BRK

Die vorliegende Studie wurde wie nachfolgend beschrieben von der Ethikkommission der LMU geprüft und genehmigt (Ethikkommission-Projekt Nr. 17-021).

Sowohl die Rekrutierung der Probanden als auch die Durchführung der Studie erfolgte im Zuge der öffentlichen Termine der mobilen Blutspende des BRK. Potentielle Spender wurden vor Ort bei der Anmeldung zur Blutspende über die Möglichkeit zur Studienteilnahme informiert. Bei Interesse erhielten sie ein studienbezogenes Formular zur Aufklärung und Einverständniserklärung, welches sie zum ärztlichen Gespräch vor der Blutspende mitführten. Durch den Arzt erfolgte neben der Eignungsprüfung für die Blutspende die Erfragung der studienspezifischen Ein- und Ausschlusskriterien. Diese sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Darüber hinaus wurden die Interessenten über Hintergründe, Nutzen, Risiken, Ablauf und Datenschutzvorschriften der Studie informiert. Bei vorläufiger Zulassung zur Spende und Zustimmung zur Studienteilnahme wurde das mitgeführte Formular durch Arzt und Proband unterzeichnet. Nach Pseudonymisierung der identifizierenden Daten stellte die faseroptische ZnPP-Bestimmung an der Unterlippe (faseroptische Lippen-Messung, LMU-LFL) die erste nicht-invasive Messung dar. Anschließend fand die kapilläre Hb-Wert-Bestimmung durch das BRK mittels Photometrie (BRK POCT-Messung, kapillär), wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben statt.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> - Regelmäßige[●] Blutspenden in den zurückliegenden 12 Monaten - Zulassung zur Blutspende am Studientag oder Ablehnung von der Blutspende aufgrund eines zu niedrigen Hb-Wertes[■] - Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung zur Studie nach Aufklärung 	<ul style="list-style-type: none"> - Transfusion von Blutprodukten in den zurückliegenden 12 Monaten - Ablehnung von der Blutspende am Studientag ohne Erniedrigung des Hb-Wertes - Bekannte Hämochromatose - Laufende oder weniger als 3 Monate zurückliegende Eisensubstitution
<p>(●): als regelmäßige Spender galten Frauen, die mindestens 3 und Männer, die mindestens 4 Blutspenden geleistet haben (■): Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) <12,5 g/dl bei Frauen und <13,5 g/dl bei Männern</p>	

Tab. 1: Ein- und Ausschlusskriterien

Bei definitiver Zulassung folgte die Blutspende mit begleitender zweiter, nicht-invasiver faseroptischer ZnPP-Messung durch den Blutentnahmeschlauch (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL). Vorab wurde neben den Proben für das BRK auch für die vorliegende Studie venöses Vollblut aus dem PDSB des Blutspendesystems entnommen. Ergab sich durch einen zu niedrigen Hb-Wert bei der vorangegangenen Messung (BRK POCT-Messung, kapillär) eine Ablehnung des Studienteilnehmers von der Blutspende, resultierte eine venöse Punktion zur Gewinnung der Vollblutproben. Nach der Blutspende oder alternativ nach der venösen Punktion endete die aktive Studienteilnahme der Probanden. Wie unter den Abschnitten 2.2.2 und 2.4 beschrieben, schloss sich daran die Analytik der venösen Blutproben sowie die Follow-up Untersuchung der kapillären Hb-Werte am Tag der Folgespende an. Der komplette Studienablauf ist in Tabelle 3 dargestellt.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, wurde nach faseroptischer Messung, Analyse der Blutproben und Follow-up Untersuchung für jeden Spender ein Satz aus bis zu 20 Parametern erhoben, die eine eingehende Beurteilung des Eisenstoffwechsels ermöglichten.

Hb [g/dl]			
BRK POCT-Messung, kapillär			
BRK POCT-Folgemessung, kapillär			
KUM Labor-Messung, venös			
ZnPP [$\mu\text{mol/mol Häm}$]			
HPLC-Messung, Volkmann Labor			
HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor			
Faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL			
Faseroptische Lippen-Messung, LMU-LFL			
Faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL			
Ergänzende Parameter			
Hämatokrit	[l/l]	Erythrozyten	[T/l]
Eisen	[$\mu\text{g/dl}$]	MCV	[fl]
Ferritin	[ng/ml]	MCH	[pg]
Transferrin	[g/l]	MCHC	[g/dl]
Transferrin-sättigung	%	RDW-CV	%
sTfR (Dade-Behring Assay)	[mg/l]	CRP	[mg/dl]

Tab. 2: Erhobene Messwerte

Rekrutierung der Probanden	
<ul style="list-style-type: none"> - Empfang durch Studienpersonal - Aushändigung des Formulars zur Studienaufklärung - Weiterleitung zum ärztlichen Vorgespräch 	
↓	
Ärztliches Vorgespräch	
<ul style="list-style-type: none"> - Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien - Studienaufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung bei Zustimmung des Spenders 	
↓	
Pseudonymisierung identifizierender Daten	
↓	
Messung 1	
<ul style="list-style-type: none"> - Faseroptische Lippen-Messung (LMU-LFL) 	
↓	
Hb-Wert-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär)	
Hb normal [●]	Hb niedrig [■]
↓	↓
Messung 2	Venöse Blutentnahme
<ul style="list-style-type: none"> - Entnahme von venösem Vollblut aus dem PDSB - Faseroptische Schlauch-Messung (LMU-LFL) begleitend zur Blutspende 	<ul style="list-style-type: none"> - Entnahme von venösem Vollblut durch direkte Punktion
<p>Ende der aktiven Studienteilnahme für Probanden nach der Blutspende oder nach der venösen Punktion</p>	
↓	
Analytik der venösen Blutproben	
↓	
Hb-Wert Follow-up (BRK POCT-Folgemesung, kapillär)	
<p>(●): Hb $\geq 12,5$ g/dl bei Frauen und $\geq 13,5$ g/dl bei Männern (■): Hb $< 12,5$ g/dl bei Frauen und $< 13,5$ g/dl bei Männern</p>	

Tab. 3: Studienablauf

2.2 Blutprobengewinnung

2.2.1 Kapilläre Blutentnahme

Im Rahmen der Blutspendetermine erfolgte eine Punktion des Ohrläppchens oder der Fingerbeere zur Bestimmung des Hb-Wertes im Kapillarblut (BRK POCT-Messung, kapillär). Die Durchführung der Probengewinnung, sowie die Messwertbestimmung oblag medizinischen Fachangestellten im Blutspendewesen in Anstellung beim BRK (MFA). Die photometrische Ermittlung der kapillären Blutwerte gelang unter Einsatz des Messgerätes CompoLab™ (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland). Der Messbereich des verwendeten Gerätes liegt bei 0,3 g/dl bis 25,5 g/dl. Im Messbereich von 1,8 g/dl bis 25,4 g/dl ist eine Messgenauigkeit von +/- 1,3% gewährleistet. Weitere zur Punktion und Analyse verwendete Materialien sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Verwendete Materialien	<ul style="list-style-type: none">- Unistik®3 Sicherheitslanzetten, Eindringtiefe 1,8 mm, 23 G (0,66 mm)- Fresenius Kabi, CompoLab TS Küvetten- Fresenius Kabi, CompoLab TM Messgerät
Besonderheiten im Studienverlauf	<ul style="list-style-type: none">- Kapilläre Blutentnahme durch Punktion des Ohrläppchens an 10 von 11 Standorten (06.09.-27.11.17)- Wechsel auf Punktion der Fingerbeere am letzten Studienort (06.12.17)

Tab. 4: Materialien, kapilläre Blutentnahme

2.2.2 Venöse Blutentnahme

Bei Zulassung zur Blutspende wurde durch die MFA eine venöse Punktion mittels Entnahmesystem für Vollblutspenden vorgenommen und das Blut aus dem PDSB gewonnen. Bei Ablehnung von der Blutspende diente anstelle des Entnahmesystems für Vollblutspenden eine venöse Punktion mittels Punktionsbesteck der Gewinnung des zu untersuchenden Vollblutes. Alle hierbei und für die weitere Verarbeitung der venösen Blutproben verwendeten Materialien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Je Studienteilnehmer wurden 8 ml Vollblut entnommen, das auf zwei Serum-Röhrchen (2 ml), sowie ein EDTA-Röhrchen (4 ml) verteilt wurde. Die Röhrchen wurden nach Sammlung aller Proben des Studientages am Studienort für die weitere Bearbeitung vorbereitet. Dafür wurde Blut aus dem EDTA-Röhrchen (4 ml) in ein kleineres EDTA-Röhrchen (1,2 ml), zwei Mikro-Schraubröhrchen (Nennvolumen 2 ml, Füllung je 500 μ l) und eine UV-Einmalküvette (Nennvolumen 550 μ l, Füllung 250 μ l) pipettiert. Materialreste wurden über Kunststoffbehälter für medizinische Abfälle des BRK entsorgt.

Vor Ort erfolgte unmittelbar nach der Pipettierung die faseroptische ZnPP-Bestimmung aus dem venösen EDTA-Blut in der UV-Einmalküvette (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL). Danach blieben je Proband zwei Serum-Röhrchen (2 ml), ein EDTA-Röhrchen (1,2 ml) und zwei Mikro-Schraubröhrchen (Füllung je 500 μ l), die dem Institut für Laboratoriumsmedizin des KUM zugeführt wurden. Der Transport der Blutproben erfolgte bei Raumtemperatur unverzüglich nach Sammlung aller Proben des jeweiligen Spendetermins. Vom Entnahmezeitpunkt bis zum Eingang der Blutproben im Institut für Laboratoriumsmedizin des KUM vergingen dabei maximal 12 Stunden. Dort erfolgte schließlich eine sofortige Kryokonservierung der Proben für die spätere HPLC-Referenzmessung durch das MVZ Labor PD Dr. Volkmann und Kollegen GbR in Karlsruhe sowie eine direkte Analyse der übrigen Proben vor Ort. Der Transport der kryokonservierten Proben nach Karlsruhe erfolgte unter Kühlung mit Trockeneis. An welchem Standort die Analytik der gewonnenen Proben erfolgte, zeigt untenstehende Tabelle 6.

Verwendete Materialien	Materialgewinnung	
	Entnahme-system für Vollblutspenden	-
Punktions-besteck	-	BD Vacutainer® Push Button Sicherheitspunktionsbesteck mit Halter (Pre-Attached), 21G (0,8x19 mm)
Blutentnahme-röhrchen	-	BD Vacutainer® Serum-Röhrchen mit Gerinnungs-aktivator, Volumen 2 ml, 13x75 mm - BD Vacutainer® EDTA-Röhrchen mit K2 EDTA (1,8 mg/ml), Volumen 4 ml, 13x75 mm
Verwendete Materialien	Bearbeitung der Proben am Studienort	
	Pipette	-
Blutröhrchen/ Küvette	-	Sarstedt, S-Monovette® K2 EDTA, Volumen 1,2 ml, 66x8 mm - Sarstedt 2,0 ml Mikro-Schraubröhre PCR-PT, 10,8x44 mm - BrandTech™ BRAND™ UV-Einmalküvette, Mikro 70-550 µl, 2x3,5 mm

Tab. 5: Materialien, venöse Blutentnahme

Labor	Analytik	Parameter
Institut für Laboratoriumsmedizin des KUM	Analyse aus Blutserum (Zentrifugation des Vollblutes durch Mitarbeiter des Labors)	Eisen Ferritin Transferrin Transferrin- sättigung sTfR CRP
Institut für Laboratoriumsmedizin des KUM	Analyse aus EDTA-Vollblut	Hb Hämatokrit Erythrozyten MCV MCH MCHC RDW-CV
MVZ Labor PD Dr. Volkman und Kollegen GbR, Karlsruhe (Volkman Labor)	HPLC-Analyse nach Kryokonservierung	ZnPP

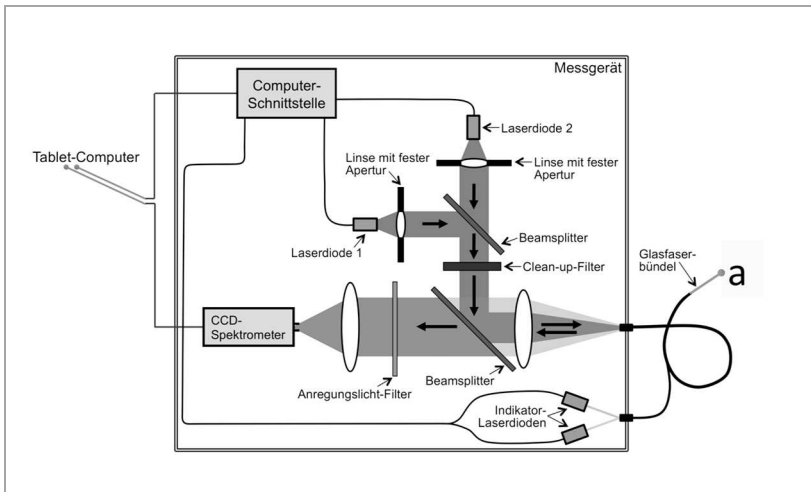
Tab. 6: Analytik der venösen Blutproben

2.3 Faseroptische ZnPP-Bestimmung (LMU-LFL)

2.3.1 Technische Grundlage

Die folgenden Abschnitte dienen der Beschreibung der angewendeten faseroptischen Messungen. In der vorliegenden Studie wurde diese Methode in unterschiedlicher Form angewendet. Die Kenntnis des Messprinzips ist Grundlage für das Verständnis der verschiedenen Messmodi und ist daher deren Beschreibung vorangestellt.

Für die faseroptische Messung werden Lichtquelle, Filtereinheit, optische Kopplung und ein Spektrometer in einem Korpus vereint, wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt.



a: Integration des Glasfaserbündels in angepassten Applikator

Abb. 2: Skizze des faseroptischen Messgerätes

Vereinfachung einer Darstellung von C. Homann, LFL 2020

Über eine USB-Schnittstelle des Gerätes besteht Kontakt zu einem Tablet-Computer, der sowohl zur Bedienung als auch zur Ausgabe der Messwerte dient. Das je nach Messmodus durch eine oder zwei Halbleiter-Laserdioden emittierte Licht (siehe Abschnitte 2.3.2 - 2.3.4) gelangt während der Messung nach optischer Kopplung in eine austauschbare flexible Glasfaser mit Applikator und darüber auf das zu untersuchende Material. Das durch den Applikator auftreffende Licht dient der Quantifizierung von ZnPP mittels Spektralanalyse. Grundlage dafür ist die Eigenfluoreszenz dieses Moleküls bei Anregung durch blaues Licht mit einem Anregungsmaximum von 425 nm Wellenlänge. Eine Laserdiode des Messgerätes emittiert Licht mit 425 nm Wellenlänge, das nach optischer Kopplung über die Glasfaser auf das Material trifft. Die dadurch hervorgerufene Fluoreszenz von ZnPP wird durch dieselbe Faser abgegriffen und dem Spektrometer im Messgerät zugeführt.

Bei der Messung von ZnPP durch die Haut der Unterlippe entsteht jedoch ein Hindernis durch die ebenfalls angeregte Eigenfluoreszenz

der umgebenden Makromoleküle, wie Elastin oder Kollagen. Diese übersteigt die Fluoreszenzintensität von ZnPP um etwa das Hundertfache, sodass die gesuchten Informationen sehr stark maskiert werden. Zur Lösung dieses Problems dient die zweite Laserdiode des Messgerätes. Sie emittiert Licht mit 407 nm Wellenlänge. Dadurch wird die Fluoreszenz von ZnPP gegenüber der Anregung bei 425 nm um 70% reduziert, wobei die Gewebeeigenfluoreszenz unverändert hoch bleibt. Durch Subtraktion der beiden Fluoreszenzspektren aus der Anregung mit beiden Wellenlängen kann der Einfluss der Gewebefluoreszenz um etwa 93% reduziert werden. Somit wird die Information über die ZnPP-Fluoreszenz durch die Differenz der Spektren zugänglich gemacht [29].

Das genannte Hindernis durch die Gewebefluoreszenz tritt bei der Küvetten- und Schlauch-Messung nicht auf. Daher wird bei diesen Messungen lediglich eine Laserdiode aktiviert und somit ausschließlich Licht mit 425 nm Wellenlänge emittiert. Der Messaufbau entsprechend Abbildung 2 bleibt dabei unverändert. Dies ermöglichte die Nutzung desselben Gerätes für alle Messmodi.

Neben der Gewebeeigenfluoreszenz bei der Lippen-Messung besteht ein weiterer Störfaktor bei der faseroptischen Detektion von ZnPP in der Reduktion des ZnPP-Signals einerseits durch Blutabsorption sowie andererseits durch die Fluoreszenz des verwandten Moleküls Protoporphyrin bei Anregung mit den genannten Wellenlängen. So konnte festgestellt werden, dass Blutabsorption und Protoporphyrin-Signal den zu ermittelnden ZnPP-Wert verfälschen würden [29]. Der Einfluss des Spektrums der Blutabsorption sowie der Protoporphyrin-Fluoreszenz wurden daher ermittelt und bei der Berechnung des schließlich ausgewerteten Fluoreszenzspektrums berücksichtigt. Dies erfolgte mittels eines integrierten spektralen Fitverfahrens unter Verwendung der Software Matlab (Version R2013a, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

Abbildung 3 zeigt am Beispiel des Blutes eines Studienteilnehmers mit hohem ZnPP-Wert bei faseroptischer Küvetten-Messung ein gemessenes Fluoreszenzspektrum. Die maximale Fluoreszenzintensität von ZnPP liegt bei einer Wellenlänge von 593 nm [32]. Es zeigt sich

entsprechend Abbildung 3 eine erhöhte Fluoreszenzintensität in diesem Bereich. Aus dieser Intensitätserhöhung im Bereich des Fluoreszenzmaximums von ZnPP lässt sich schließlich der ZnPP-Wert errechnen.

Die Präzision des beschriebenen Verfahrens wurde in einer der bereits abgeschlossenen Studie an 56 Frauen post partum für die faseroptische Lippen-Messung untersucht und mit $1,9 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ (Range: $1,1\text{-}2,9 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$) angegeben [29].

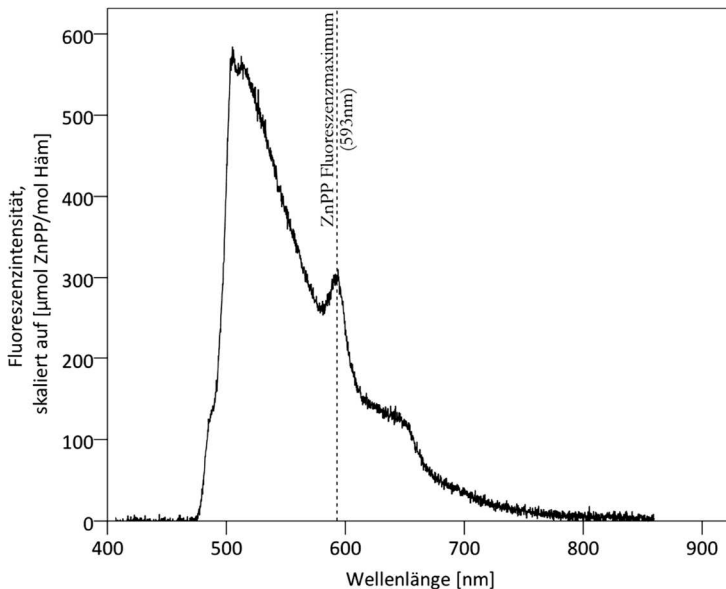


Abb. 3: Fluoreszenzspektrum der Blutprobe eines Studienteilnehmers (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL)

Auf dieser Grundlage erfolgten alle faseroptischen Messungen durch das der Ethikkommission gemeldete Prüfteam. Vier Mitarbeiter des Laser-Forschungslabors, die maßgeblich an der Entwicklung der faseroptischen Messtechnik beteiligten waren, bildeten die Assistenz der Prüfung und verantworteten den Einsatz der Testgeräte bei der mobilen Blutspende des BRK.

Für die verschiedenen Anwendungen im Rahmen der Studie standen angepasste Applikatoren bereit, welche untenstehend näher beschrieben werden.

2.3.2 Faseroptische Küvetten-Messung (LMU-LFL)

Das aus dem PDSB oder mittels Punktionsbesteck entnommene venöse Vollblut wurde am Studienort aus dem 4 ml EDTA-Blutröhrchen in eine UV-Einmalküvette pipettiert. Je Proband erfolgte eine Pipettierung von 250 μ l. Anschließend wurde das Blut in der Küvette mittels Sichtkontrolle auf Blasen überprüft. Bei der Prüfung des Gerätes durch das Studienteam vor der Studiendurchführung hatte sich gezeigt, dass Blasenbildung beim Pipettieren zu fälschlicherweise niedrigen ZnPP-Werten führt. Um falsch negative Werte ausschließen zu können, wurde die Pipettierung im Rahmen der Studie bei Blasenbildung wiederholt. Zur ZnPP-Bestimmung diente das faseroptische Messverfahren unter Verwendung eines Applikators zur definierten Fixierung der Glasfaser an der UV-Einmalküvette, wie in Abbildung 4 zu sehen. Der Küvetten-Applikator aus lichtundurchlässigem Kunststoff stand mit der Glasfaser so in Verbindung, dass das Licht senkrecht durch die Wand der Küvette auf das darin befindliche Blut traf. Um eine Verfälschung der Messwerte durch Lichteinfall zu vermeiden, wurde der Applikator nach Einsetzen der Küvette mit einem ebenfalls aus lichtundurchlässigem Kunststoff gefertigtem Deckel verschlossen. Für die Ermittlung des ZnPP-Wertes erfolgten anschließend zwei Messungen. Je Messung wurden 100 Spektren bei 425 nm Anregungswellenlänge bei einer Integrationszeit von 50 ms aufgenommen.

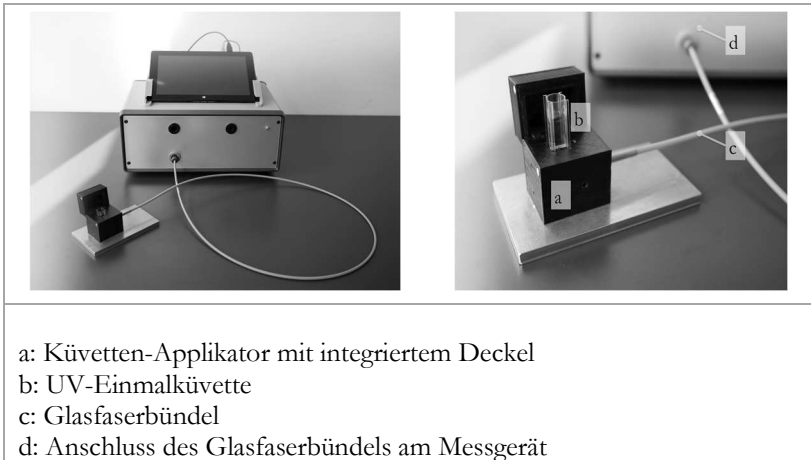


Abb. 4: Messaufbau der faseroptischen Küvetten-Messung (LMU-LFL)
 Eigene Fotografien

Da es durch lange Beleuchtung von Blut mit Laserlicht dieser Wellenlänge aufgrund der Lichtempfindlichkeit des ZnPP-Moleküls zu falsch negativen Werten kommen kann, wurde die Küvette zwischen erster und zweiter Messung 180 Grad um ihre vertikale Achse gedreht, sodass jeweils ein neues Messvolumen entstand. Je Messung wurden ausschließlich die ersten 4 der 100 ermittelten Spektren verwendet und zum endgültigen Messwert gemittelt.

Dies hatte, ebenso wie das Drehen der Küvette, die Vermeidung falsch negativer Messwerte zum Ziel. Die übrigen Spektren dienen lediglich dem zusätzlichen Informationsgewinn über das Verhalten der ZnPP-Moleküle bei anhaltender Beleuchtung mit Laserlicht. Abbildung 5 veranschaulicht den Abfall der detektierten ZnPP-Konzentration bei anhaltender Beleuchtung der blutgefüllten Küvette am Beispiel eines Studienteilnehmers mit fortgeschrittenem Eisenmangel bei einem ZnPP-Wert (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL) von 105 $\mu\text{mol/mol}$ Häm.

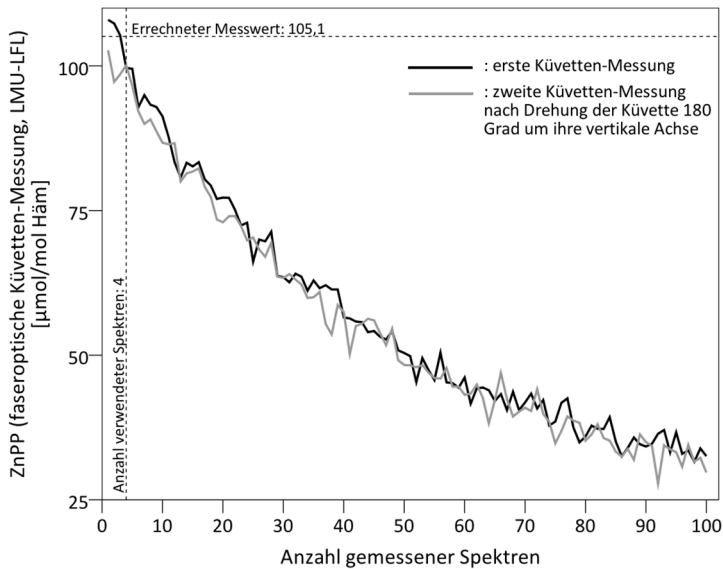


Abb. 5: ZnPP-Abfall bei anhaltender Laser-Belichtung der blutgefüllten Küvette (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL)

Die Lichtempfindlichkeit des ZnPP-Moleküls zeigt sich zudem eindrücklich in Abbildung 6. Die hohe Fluoreszenzintensität von ZnPP bei 593 nm Wellenlänge ist bei Aufnahme des einhundertsten gegenüber dem ersten Spektrum deutlich erniedrigt und veranschaulicht damit den ZnPP-Fluoreszenzintensitäts-Abfall bei anhaltender Laser-Belichtung. Anhand der Daten aller Studienteilnehmer zum ZnPP- Fluoreszenzintensitäts-Abfall bei dauerhafter Belichtung mit genanntem Laserlicht wurde untersucht, ob sich eine Funktion des ZnPP-Fluoreszenzintensität-Abfalls ableiten lässt, sodass unter Berücksichtigung des definierten Fluoreszenzintensitäts-Abfalls eine Nutzung aller Spektren möglich wäre. Dieser Ansatz hat allerdings, gegenüber der Nutzung der ersten 4 Spektren zu erhöhten Messwertschwankungen geführt und wurde daher verworfen.

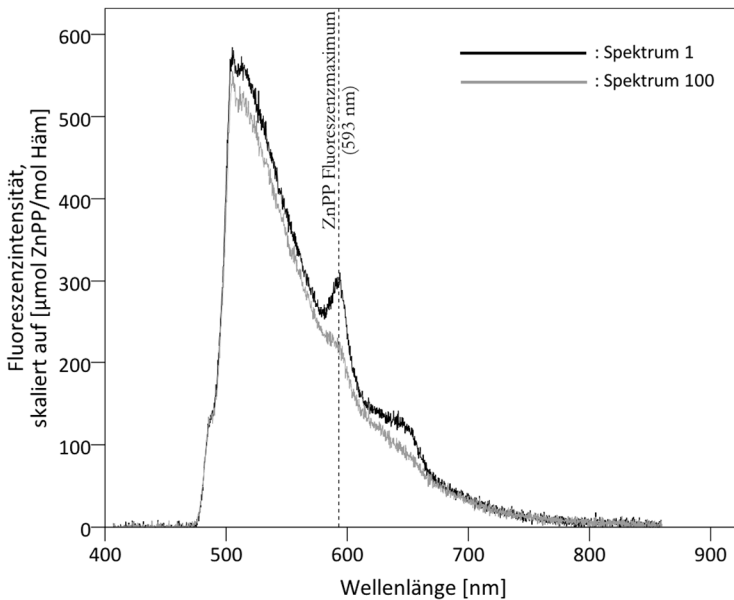


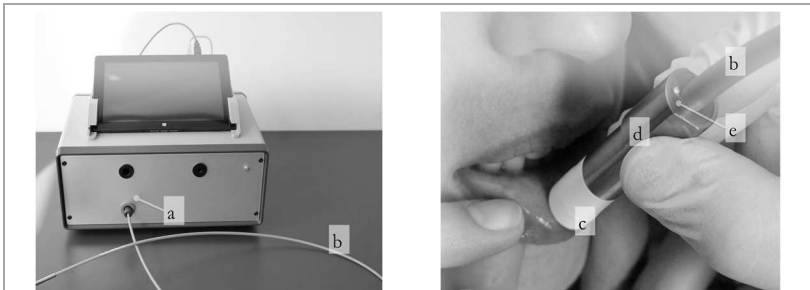
Abb. 6: Reduktion der ZnPP-Fluoreszenzintensität zwischen 1. und 100. Fluoreszenzspektrum (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL)

2.3.3 Faseroptische Lippen-Messung (LMU-LFL)

Für die transdermale Messung an der Unterlippe (faseroptische Lippen-Messung, LMU-LFL) wurde die Glasfaser des Messgerätes mit einem Applikator aus Edelstahl verbunden, der in Unterscheidung zum Küvetten-Applikator über eine Indikatorleuchte verfügte. Diese Indikatorleuchte zeigte über einen Farbcode die Eignung der gewählten Position des Lippen-Applikators für den Messvorgang an. Als Messort wurde die Schleimhaut der Unterlippe am Übergang von verhorntem zu unverhorntem Plattenepithel gewählt. An dieser Stelle ist eine optische Messung gut durchführbar, da die dünne Epithelschicht nicht pigmentiert, reich vaskularisiert und gut zugänglich ist. Um die Bedienung des Messgerätes während des Messvorgangs zu erleichtern, wurde ein Fußschalter angeschlossen. Zur Vorbereitung des Messvorgangs wurde der Lippen-Applikator vor jedem Probanden mittels schleimhautverträglicher Wischdesinfektion gereinigt.

Anschließend wurde eine Kalibrierung zur Funktionskontrolle durchgeführt und eine Schutzkappe gegen mögliche Kontamination auf den Applikator aufgesetzt, durch deren transparente Membran die Messung erfolgte. Die hierfür verwendeten Materialien sind Tabelle 7 zu entnehmen. Zur Messung wurde die Unterlippe des Probanden leicht nach unten gezogen und der Applikator ohne Druck auf die Schleimhaut der Lippe an der Grenze zum Lippenrot aufgesetzt, wie in Abbildung 7 dargestellt.

Die Betätigung des Fußschalters startete den automatisierten Vorgang zum Aufspüren einer geeigneten Messstelle. Beim Entlangfahren des Sensors auf der Haut mit Blick auf die Indikatorleuchte, konnte bei grünem Indikatorsignal von genügender Durchblutung und somit guten Voraussetzungen für die Messung ausgegangen werden. Erneutes Betätigen des Fußschalters startete daraufhin die faseroptische ZnPP-Bestimmung, bei welcher der Sensor weiterhin ohne Druck auf der ermittelten Stelle gehalten wurde. Dabei wurden 30 Spektren bei Anregung mit beiden Wellenlängen (425 nm und 407 nm) bei jeweils 15 ms Integrationszeit aufgenommen. Nach Beenden der ersten Messung wurden alle Schritte inklusive des Aufsuchens einer geeigneten Messstelle zwei Mal wiederholt. Der erhobene Messwert entsprach dem Mittelwert aus den drei durchgeführten Messungen. Die Auswertung umfasste neben der Bildung des Mittelwerts aus den insgesamt 90 Spektren der drei Messungen eine Prüfung der Spektren. Bei Abweichungen, die beispielsweise auf zu starken Einfall von Umgebungslicht hindeuteten, wurde das entsprechende Spektrum verworfen und floss somit nicht in den endgültigen Messwert ein.



- a: Anschluss des Glasfaserbündels am Messgerät
- b: Glasfaserbündel
- c: Schutzkappe mit transparenter Membran
- d: Lippen-Applikator
- e: Indikatorleuchte

Abb. 7: Messaufbau und Applikation der faseroptischen Lippen-Messung (LMU-LFL)
Eigene Fotografie (links) / Fotografie von C. Homann, LFL 2017 (rechts)

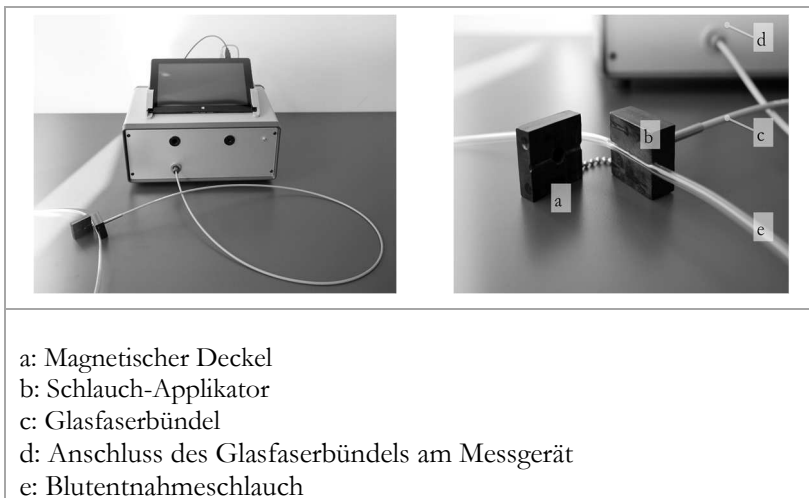
Verwendete Materialien	<ul style="list-style-type: none"> - Schülke Octenisept®, wässriges Wund- und Schleimhautantiseptikum - Einmalkappen, Sonderanfertigung Maplastic GmbH
------------------------	--

Tab. 7: Materialien, faseroptische Lippen-Messung (LMU-LFL)

2.3.4 Faseroptische Schlauch-Messung (LMU-LFL)

Die Messung während der Blutspende erforderte eine Platzierung der Glasfaser des Messgerätes in einem weiteren angepassten Applikator aus lichtundurchlässigem Hartplastik. Der Schlauch-Applikator für die hier erstmals angewandte Messung (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL) wurde, wie aus Abbildung 8 ersichtlich so entworfen, dass der Blutentnahmeschlauch in einer definierten Einsenkung gehalten wurde und somit in direktem Kontakt mit der darin befindlichen Glasfaser stand. Um fehlerhafte Messungen durch Lichteinfall zu vermeiden, wurde der Applikator durch einen ebenfalls aus lichtundurchlässigem Kunststoff bestehenden Deckel magnetisch

verschlossen. Um auch Verfälschungen durch Verunreinigung ausschließen zu können, wurde die verwendete Schlauchstelle vor der Messung mit dem in Tabelle 8 genannten Material alkoholisch desinfiziert und ohne erneute Berührung in den Applikator eingebracht.



- a: Magnetischer Deckel
- b: Schlauch-Applikator
- c: Glasfaserbündel
- d: Anschluss des Glasfaserbündels am Messgerät
- e: Blutentnahmeschlauch

Abb. 8: Messaufbau der faseroptischen Schlauch-Messung (LMU-LFL)
Eigene Fotografien

Der Messvorgang wurde an drei Schlauchstellen durchgeführt. Je Messung wurden 200 Spektren bei 425 nm Anregungswellenlänge bei 50 ms Integrationszeit aufgenommen. Gemittelt wurden lediglich die Spektren 20 bis 200. Die ersten 19 Spektren wurden verworfen, da eine Veränderung des Blutflusses durch das Anbringen des Schlauch-Applikators und der damit verbundenen Bewegung des Schlauches nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Verwendung der Spektren 20 bis 200 sollte somit konstante Messbedingungen ohne Einfluss der genannten Manipulation und möglichen Bewegungsartefakten gewährleisten. Als endgültiger Messwert wurde schließlich der Mittelwert aus den drei durchgeführten Schlauch-Messungen festgehalten.

Verwendete Materialien	- Hartmann Cutasept® F, farbloses Hautantiseptikum auf Propanolbasis
------------------------	--

Tab. 8: Materialien, faseroptische Schlauch-Messung (LMU-LFL)

2.4 Follow-up Untersuchung

Zusätzlich zu den beschriebenen Messungen und labormedizinischen Untersuchungen wurde der kapilläre Hb-Wert der Blutspender am Tag der Folgespende erhoben, um den Vorhersagewert der ZnPP-Bestimmung anhand des Verlaufs prüfen zu können. Mithilfe der Studienidentifikationsnummer erfolgte eine einmalige Entschlüsselung und ein Abruf der Spenderinformationen über die Datenbank des BRK. Der Zugriff fand sechs Monate nach Rekrutierung des letzten Studienteilnehmers statt. Bei 91% der Probanden lag eine Folgespende im genannten Zeitraum vor.

2.5 Statistik

Die Auswertung der generierten Messwerte fand unter Verwendung der Statistik-Software IBM SPSS Statistics v24 statt. Für alle Analysen wurde zur Ermittlung der Signifikanz eine Irrtumswahrscheinlichkeit bei Annahme der entsprechenden Hypothese von maximal 5% zugrunde gelegt.

2.5.1 Fallzahlplanung

Ein wichtiges Mittel zur Beurteilung der neuartigen faseroptischen Messmethodik war der Vergleich mit einer verlässlichen Referenz. Es wurde dafür auf die etablierte ZnPP-Bestimmung mittels HPLC zurückgegriffen, die am MVZ Labor PD Dr. Volkmann und Kollegen GbR unter laborinterner Qualitätskontrolle nach Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiliBÄK) durchgeführt wurde. Eine hohe Aussagekraft des Methodenvergleichs wurde der Fallzahlplanung als Ziel zugrundegelegt. Eine Fallzahlschätzung nach Bland und Altman ergab dabei, dass 533 Probanden notwendig wären, um mit 97,5%-iger Sicherheit festlegen zu können, dass die Übereinstimmungsgrenzen (LoA) einer Messmethode um weniger als 7,5% von der Vergleichsmethode abweichen.

Bei der hier erstmals durchgeführten ZnPP-Bestimmung am Blutentnahmeschlauch im Sinne einer Machbarkeitsstudie wurde jedoch zugunsten einer zeitnahen orientierenden Einschätzung auf eine derart hohe Fallzahl verzichtet. Dennoch sollte eine Beurteilung der Verlässlichkeit der Untersuchungen bei reduzierter Probandenzahl erfolgen. Da die Studienpopulation als Stichprobe aus der Gesamtzahl der 245 945 Spender im Studienjahr 2017 in Bayern [22] gesehen werden kann, wurde dafür untenstehende Formel zur Berechnung des Stichprobenumfangs [33, 34] verwendet.

$$\text{Stichprobengröße} = \frac{\frac{z^2 \times p \times (1-p)}{e^2}}{1 + \frac{\left(\frac{z^2 \times p \times (1-p)}{e^2}\right) - 1}{n}}$$

Es wurde festgelegt, dass die Abweichung der Ergebnisse der Studienpopulation von den Ergebnissen der Gesamtpopulation (n=245 945) maximal 10% (Stichprobenfehler $e=0,10$) betragen sollte. 95% der Werte sollten innerhalb dieser Abweichung von 10% liegen (95%-Konfidenzintervall). Dies entspricht bei Annahme der Standardnormalverteilung einem Z-Wert (z) von 1,96. Die Studie enthielt noch nie zuvor erhobene Größen und keine diesbezüglichen Daten aus der Gesamtpopulation. Es wurde daher ein neutraler Mittelwert der Grundgesamtheit von 50% ($p=0,5$) angenommen, um eine hinreichende Größe des Stichprobenumfangs zu gewährleisten. Die Berechnung ergab unter Verwendung der genannten Werte eine Stichprobengröße von mindestens 96 Probanden. Die Abweichung vom wahren Wert der Gesamtpopulation liegt damit bei der Untersuchung von 100 Studienteilnehmern bei unter 10%. Es ist anzunehmen, dass dieser in Realität noch niedriger ist, da die eigentliche Bezugspopulation aus regelmäßigen Spendern der Landkreise München und Augsburg besteht und damit gegenüber allen Spendern Bayerns deutlich geringer ausfällt.

2.5.2 Stichproben

Die gewonnenen Datensätze der vorliegenden Studie beruhen vorwiegend auf wiederholten Messungen an derselben Studienpopulation. Daher lagen für die Statistik vor allem verbundene Stichproben vor. Einzig für die Analyse der ZnPP-Differenzen in Abhängigkeit vom Hb-Verlauf im Follow-up wurden zwei Untergruppen der Studienpopulation miteinander verglichen und somit unabhängige Stichproben untersucht.

2.5.3 Verteilungsanalyse

Als Basis für die Auswahl der statistischen Tests wurde eine Verteilungsanalyse aller zu untersuchenden Daten vorgenommen.

Die Ergebnisse aus kapillärer (BRK POCT-Messung, kapillär) und venöser (KUM Labor-Messung, venös) Hb-Wert-Bestimmung sowie die Wertepaar-differenzen zwischen kapillärem Hb und kapillärem Hb im Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär) waren normalverteilt. Bei Untersuchung der Wertepaar-differenzen im Hb Follow-up zeigten sich signifikante Abweichungen von der Normalverteilung. Die Datensätze aus den unterschiedlichen ZnPP-Messungen und deren Gegenüberstellung waren in keinem Fall normalverteilt.

Alle Abbildungen und Tabellen zur Verteilungsanalyse sind in Anhang 1 zusammengefasst.

2.5.4 Statistische Tests

Die Ergebnisse der untenstehend zusammengefassten Analysen finden sich im Ergebnis- und Diskussionsteil sowie zur Gewährleistung der Vollständigkeit in ergänzenden Datentabellen der Anhänge 2 und 3.

2.5.4.1 Zentrale Tendenz

Für die normalverteilten, verbundenen Stichproben wurde zum Mittelwertvergleich ein t-Test gewählt. Die Korrelation der beiden Messungen wurde mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten quantifiziert.

Für die Mehrzahl der Untersuchungen lagen jedoch verbundene Stichproben mit fehlender Normalverteilung vor. Für den Mittelwertvergleich wurde daher auf den Wilcoxon-Test zurückgegriffen, um gegenüber dem t-Test eine hohe Teststärke zu gewährleisten. Aufgrund des Verteilungsmusters wurde die Rangkorrelation nach Spearman als nicht-parametrisches Verfahren dem Pearson-Korrelationskoeffizienten vorgezogen.

Für die Follow-up-Analyse der verbundenen Stichproben ohne Normalverteilung diente der Mann-Whitney-U-Test.

2.5.4.2 Diagnostische Güte

Zur Beurteilung der diagnostischen Güte der angewandten Messmethoden wurden Sensitivität und Spezifität mithilfe von Kontingenztafeln berechnet. Zur Vorhersage der Krankheitswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Untersuchungsergebnis dienten positives und negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis (LR^+ , LR^-). Diese wurden als prävalenzunabhängiges Verfahren dem prävalenzabhängigen positiven und negativen prädiktiven Wert vorgezogen.

Die Ermittlung gesuchter Cutoffs erfolgte mittels ROC. Um die maximale diagnostische Effektivität der Messungen bei Gleichgewichtung von Sensitivität und Spezifität zu ermitteln, wurde der Youden-Index (Sensitivität+Spezifität-1) als Zusammenfassung der erstellten ROC-Kurve herangezogen [35].

2.5.4.3 Übereinstimmung der Messmethoden

Für den Methodenvergleich folgte die Berechnung der LoA und vorliegender Bias mittels Bland-Altman-Plot. Diese statistische Methode ist für die Untersuchung normalverteilter Wertepaardifferenzen ausgelegt. Die Verletzung dieser Voraussetzung birgt die Gefahr einer reduzierten Präzision der berechneten LoA. Für die Wertepaardifferenzen des Methodenvergleichs lagen keine normalverteilten Daten vor. Allerdings zeigten sich diese im Kern bei Entfernung der Ausreißer außerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstandes, wie Tabelle 31 in Anhang 1 zu entnehmen. In Anbetracht dieser Tatsache und unter Annahme des zentralen

Grenzwertsatzes ist von einer unerheblichen Abweichung von der Normalverteilung und genügend präziser Schätzung der LoA mit Übertragbarkeit auf andere Stichproben auszugehen. Der Bland-Altman-Plot wurde daher als geeignetes Mittel für die Beurteilung der Übereinstimmungen zwischen den Messungen angesehen.

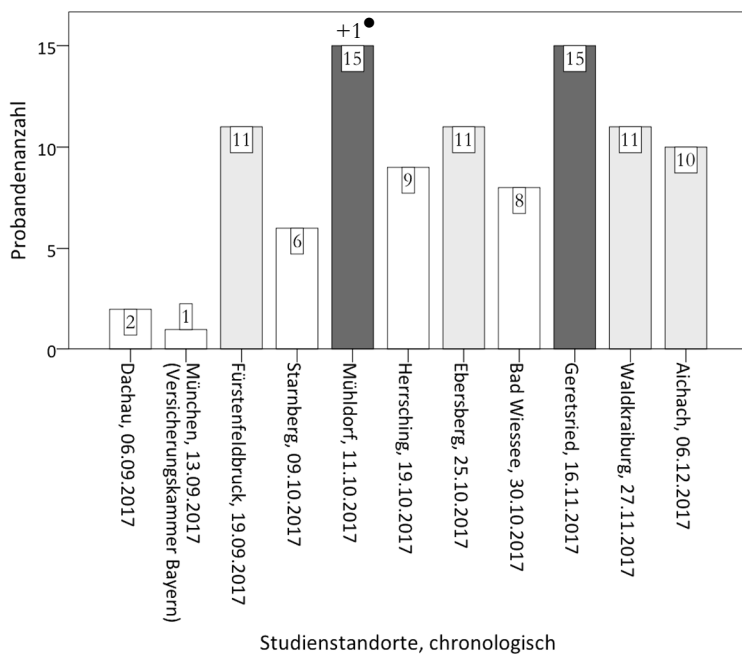
3 Ergebnisse

Dieses Kapitel ist einer Übersicht der verarbeiteten Daten gewidmet. Im Vordergrund stehen dabei die Auswertungen des Eisenstatus der Studienpopulation, die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Messungen sowie die diagnostische Güte der jeweiligen Messmethode. Die zentrale Tendenz von Wertepaardifferenzen und die Korrelation von Wertepaaren bilden einen Teil der genannten Untersuchungen. Da aufgrund dieser statistischen Ergebnis-Analysen keine Aussage zur Übereinstimmung der Messungen getroffen werden kann [36], schließt sich daran eine Bland-Altman-Analyse der angewendeten Messmethoden an.

3.1 Studienpopulation

Auf die unter 2.1 beschriebene Art und Weise wurden beim Besuch von 11 Standorten im Landkreis München und Augsburg 100 Blutspender beiderlei Geschlechts in die Studie eingeschlossen. Abbildung 9 sind die jeweiligen Studienstandorte mit Datum sowie Anzahl der rekrutierten Probanden zu entnehmen.

Die in Abbildung 10 zusammengefasste Studienpopulation ($n=100$) setzte sich nach abgeschlossener Rekrutierung aus 40% Frauen und 60% Männern zusammen. Der Mittelwert des Alters lag bei den weiblichen Probanden bei 46 Jahren (Altersbereich: 18-70 Jahre, Median: 51 Jahre) und bei den männlichen Probanden bei 51 Jahren (Altersbereich: 20-72 Jahre, Median: 52 Jahre).



(●): Proband, der die Studienteilnahme vorzeitig beendete und aufgrund fehlender venöser Blutproben nicht für alle Berechnungen berücksichtigt werden konnte

Abb. 9: Studienstandorte

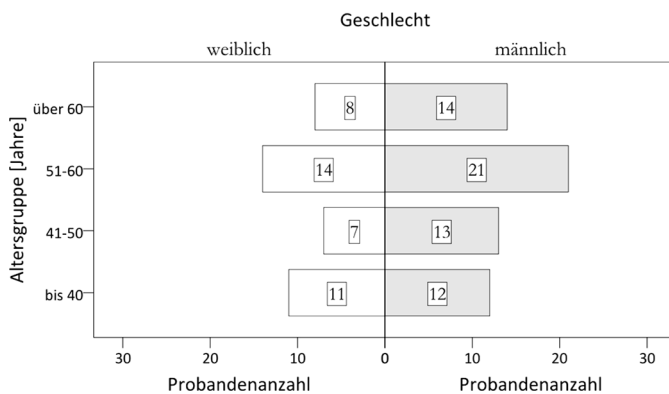


Abb. 10: Studienpopulation

3.2 Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation

Zuvor wurde festgestellt, dass regelmäßige Blutspender eine Hochrisikogruppe für Eisenmangel darstellen. Um diese Aussage untermauern zu können, wurde die Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation analysiert. Etablierte Blutparameter der Probanden dienten dabei der Beurteilung des Eisenstatus. Alle dafür herangezogenen Werte wurden aus venösem Vollblut am Institut für Laboratoriumsmedizin des KUM bestimmt. Es erfolgte eine Einteilung nach Stadien des Eisenmangels, die in der Literatur zum Thema Eisenmangeldiagnostik bereits vielfach angewandt wurde und auch von der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie empfohlen wird [24, 26, 37]. Unterschieden werden, wie Tabelle 9 zu entnehmen, drei Gruppen. Eisenmangelstadium I entspricht erschöpften Eisenspeichern. In Stadium II besteht ein funktioneller Eisenmangel mit IDE, der bei anhaltendem Eisenmangel in Stadium III mit Eisenmangelanämie übergeht.

	Ferritin	sTfR	Hb
Stadium I	Reduziert	Normal	Normal
Stadium II	Reduziert	Erhöht	Normal
Stadium III	Reduziert [●]	Erhöht [■]	Reduziert [▲]

(●): Ferritin <15 µg/l bei Frauen und <30 µg/l bei Männern
 (■): sTfR >1,760 mg/l
 (▲): Hb (KUM Labor-Messung, venös) <12 g/dl bei Frauen und <13 g/dl bei Männern

Tab. 9: Stadieneinteilung des Eisenmangels

Nach den oben genannten Kriterien konnten zunächst 90% der Studienteilnehmer kategorisiert werden. 43% zeigten keine Anzeichen eines Eisenmangels, bei 26% lagen reduzierte Eisenspeicher vor (Eisenmangelstadium I), 14% der Teilnehmer konnten bei bestehender eisendefizitärer Erythropoese (Eisenmangelstadium II) zugeordnet werden und bei 7% lag bereits eine Eisenmangelanämie

(Eisenmangelstadium III) vor. 9% der Teilnehmer zeigten Wertekonstellationen, die keine Zuordnung in eine der genannten Gruppen zuließen und 1% wurde nicht erfasst, wie aus Abbildung 11 hervorgeht.

Unter den Teilnehmern, deren Blutwerte keine unmittelbare Zuordnung möglich machten, gelang eine Einstufung unter Betrachtung der in Tabelle 10 aufgeführten, ergänzenden Laborparameter. Neben den im Labor ermittelten Werten erfolgte die Berechnung des Ferritin-Index ($sTfR/\log$ Ferritin), um eine bestmögliche Differenzierung zwischen Eisenmangelanämie und Anämie bei chronischer Erkrankung vornehmen zu können [38-40].

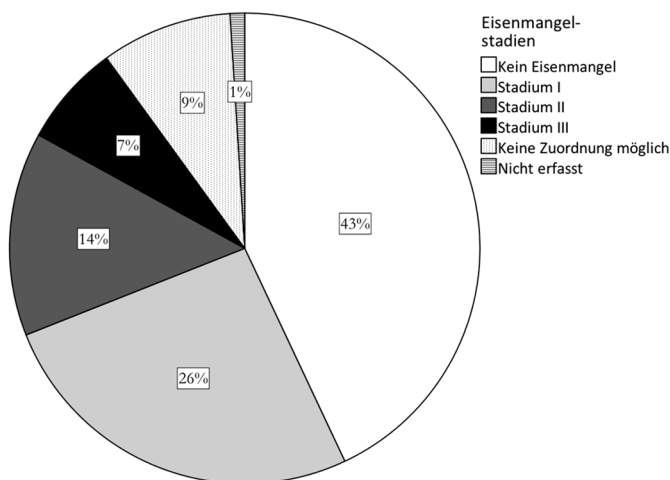


Abb. 11: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Stadien

Durch die Zusammenschau aller Parameter konnte unabhängig von der Stadieneinteilung festgelegt werden, ob zum Zeitpunkt der Messung ein Eisenmangel (Eisenmangel, nicht näher bezeichnet) bestand. Die Eisenmangelprävalenz lag nach Berücksichtigung dieser Einstufung und unter Ausschluss der nicht erfassten, entsprechend Abbildung 12 (n=100-1) bei 53%.

Die Einteilung nach Geschlecht ergab eine höhere Eisenmangelprävalenz von 57,5% der teilnehmenden Frauen gegenüber 50,8% bei den teilnehmenden Männern. Wie in Abbildung 13 dargestellt, litten prozentual knapp doppelt so viele Frauen unter einer Eisenmangelanämie (Eisenmangelstadium III), wohingegen die Prävalenz von eisendefizitärer Erythropoese (Eisenmangelstadium II) unter den männlichen Studienteilnehmern überwog.

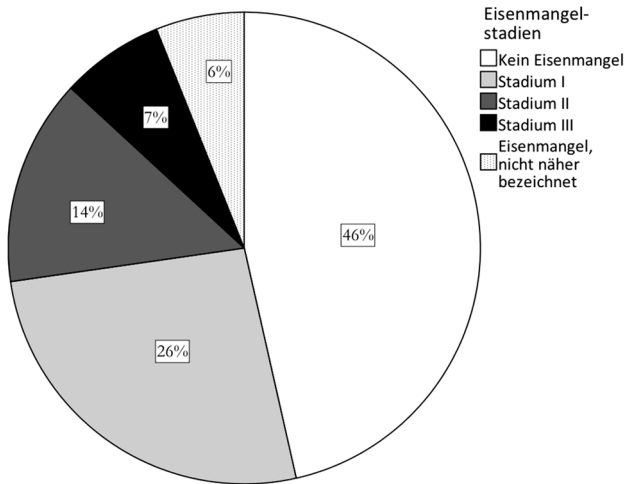


Abb. 12: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Stadien und ergänzender Labordiagnostik

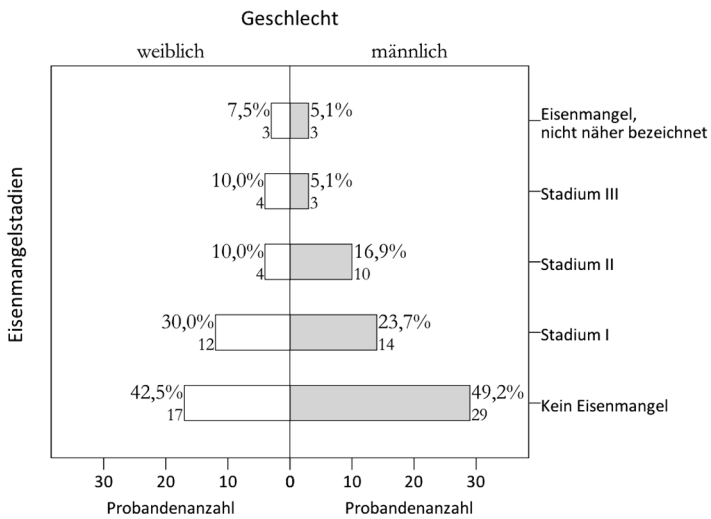


Abb. 13: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Geschlecht

Teilnehmer-ID	Ferritin	sTfR	Hb (KUM Labor-Messung, venös)	CRP	Ferritin-Index	MCV	MCH	Serum-Transferrin	Transferrin-Sättigung	Eisenmangel	Bemerkung
17	-	g	-	n	+	g	-	+	-	b	Bestätigter Eisenmangel bei Ferritin-Reduktion und Ferritin-Index-Erhöhung
24	-	n	-	n	g	n	n	n	-	b	
50	-	n	-	n	+	n	n	n	-	b	
51	-	n	-	+	+	n	n	+	n	b	
8	n	+	n	n	n	-	-	+	n.e	b	Bestätigter Eisenmangel bei sTfR-Erhöhung und mikrozytären, hypochromen Erythrozyten
12	n	+	-	n	n	-	-	n	n.e	b	
47	n	n	-	n	n	n	n	n	n	n.b	Nicht sicher auf Eisenmangel zurückführbare Wertekonstellationen
58	n	+	n	n	n	n	n	n	n	n.b	
92	+	+	n	n	n	g	-	n	n	n.b	
(+/-): erhöht/vermindert (n.e): nicht erhoben (n.b): nicht bestätigt (b): bestätigt (g): grenzwertig (n): normwertig											

Tab. 10: Ergänzende Labordiagnostik derjenigen Studienteilnehmer, die initial keinem Eisenmangelstadium zuzuordnen waren

Die Altersverteilung der Eisenmangelstadien bei männlichen und weiblichen Probanden zeigte eine höhere Prävalenz von Eisenmangelanämie in jüngeren Jahren, sodass bei Männern über 60 Jahren und Frauen über 50 Jahren in keinem Fall eine Eisenmangelanämie festgestellt wurde. Auffällig war zudem, wie in den folgenden Abbildungen 14 und 15 veranschaulicht, dass es ausschließlich in der jüngsten Gruppe der Frauen keine Probandin ohne Eisenmangel gab.

Wie bereits erwähnt, konnte für 1% der Studienpopulation, welches dem Studienteilnehmer ohne erfasste Blutparameter entspricht, keine Aussage über den Eisenmangel anhand von Vergleichsmessungen gemacht werden. Aufgrund der mangelnden Beurteilbarkeit ohne Referenz wird 1% daher von folgenden Analysen ausgeschlossen, die Informationen aus der venösen Vollblutanalyse voraussetzen.

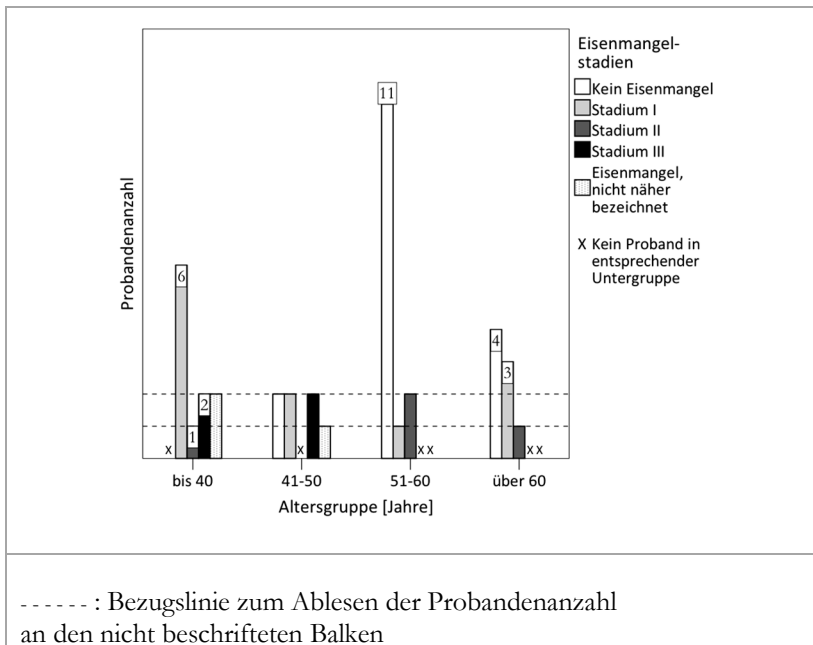


Abb. 14: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Alter, Frauen

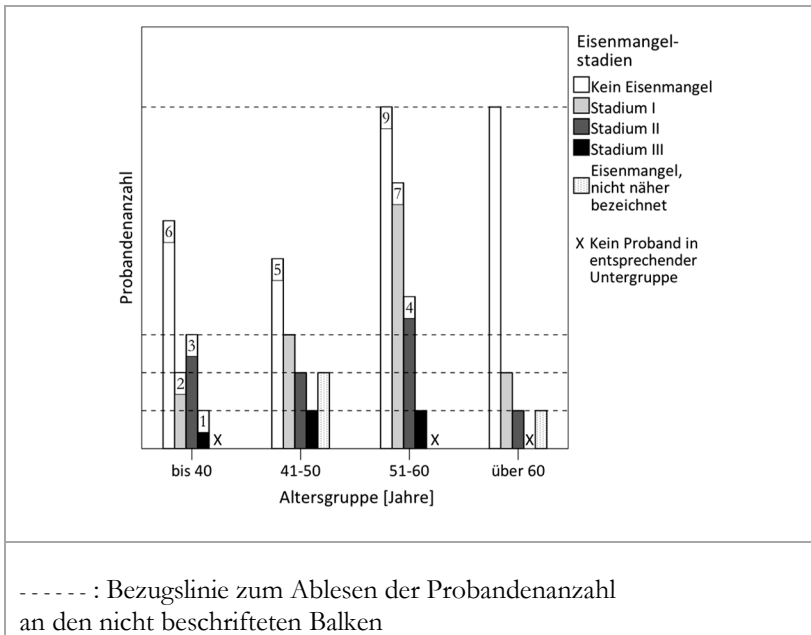


Abb. 15: Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation nach Alter, Männer

3.3 Zentrale Tendenz

In der vorliegenden Arbeit wurden Hb- und ZnPP-Werte mithilfe verschiedener Messmethoden untersucht. Im Follow-up wurden die kapillären Hb-Werte (BKR POCT-Messung, kapillär) zusätzlich zu einem späteren Zeitpunkt erneut ermittelt (BRK POCT-Folgemessung, kapillär). Im Folgenden sollen die Unterschiede der Ergebnisse in Abhängigkeit von der jeweiligen messtechnischen oder zeitlichen Variation analysiert werden.

3.3.1 Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) in Gegenüberstellung zu Hb (KUM Labor-Messung, venös)

Bisher wurden für die Beurteilung des Eisenstatus der Studienteilnehmer die Hb-Werte betrachtet, welche nach der Gewinnung von venösem EDTA-Vollblut am Institut für

Laboratoriumsmedizin des KUM ermittelt wurden (KUM Labor-Messung, venös). Von jedem Probanden lag zusätzlich der Hb-Wert aus der POCT-Messung am Studienort vor, welcher der Feststellung der Spendereignung bei der Blutspende diente (BRK POCT-Messung, kapillär). Bei Gegenüberstellung der Hb-Werte aus den beiden Messmethoden zeigten sich verschiedene Auffälligkeiten.

Es konnte im Rahmen der Verteilungsanalyse festgestellt werden, dass die erhobenen Hb-Messwerte beider Methoden normalverteilt waren, aber keine Normalverteilung für die Wertepaar differenzen (Hb (KUM Labor-Messung, venös) – Hb (BRK POCT-Messung, kapillär)) vorlag. Die deskriptive Statistik sowie ein Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben ergaben einen auf dem 1%-Niveau signifikanten Unterschied in der zentralen Tendenz der beiden Messmethoden, wie aus Tabelle 11 ersichtlich. Abbildung 16 veranschaulicht die Differenz der Messwerte mit vorwiegend höheren Hb-Werten bei der kapillären Hb-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär). Tabelle 12 sowie die korrespondierende Abbildung 17 zeigen, dass jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen den beiden Messungen vorlag.

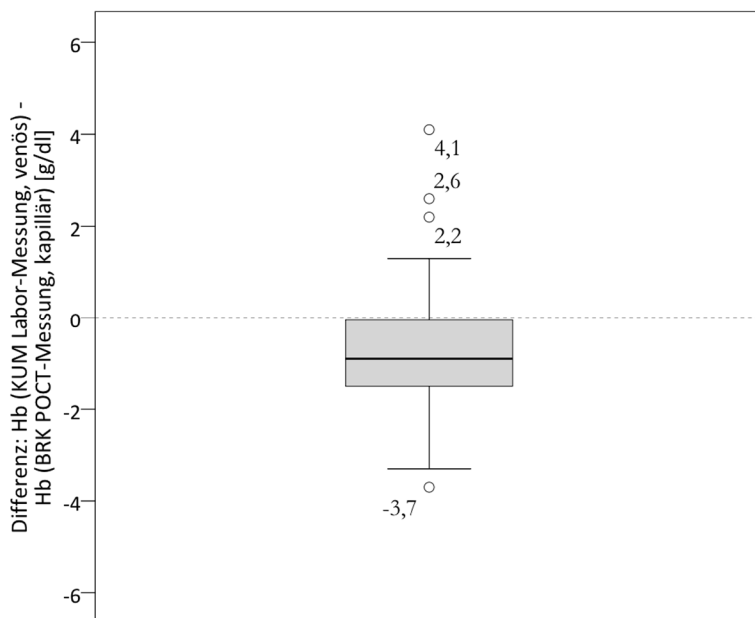


Abb. 16: Differenz: Hb (KUM Labor-Messung, venös) – Hb (BKR POCT-Messung, kapillär), Box-Whisker-Plot

Differenz: Hb (KUM Labor-Messung, venös) – Hb (BKR POCT-Messung, kapillär)	Positive Ränge [n]	24
	Negative Ränge [n]	74
	Asymptotische Signifikanz	p<0,001
	Errechnete Effektstärke [•] (basierend auf positiven Rängen)	r=0,593 ((-5,867/√98))
^(•) : $r = (Z/\sqrt{n}) $		

Tab. 11: Differenz: Hb (KUM Labor-Messung, venös) – Hb (BKR POCT-Messung, kapillär), Wilcoxon-Test

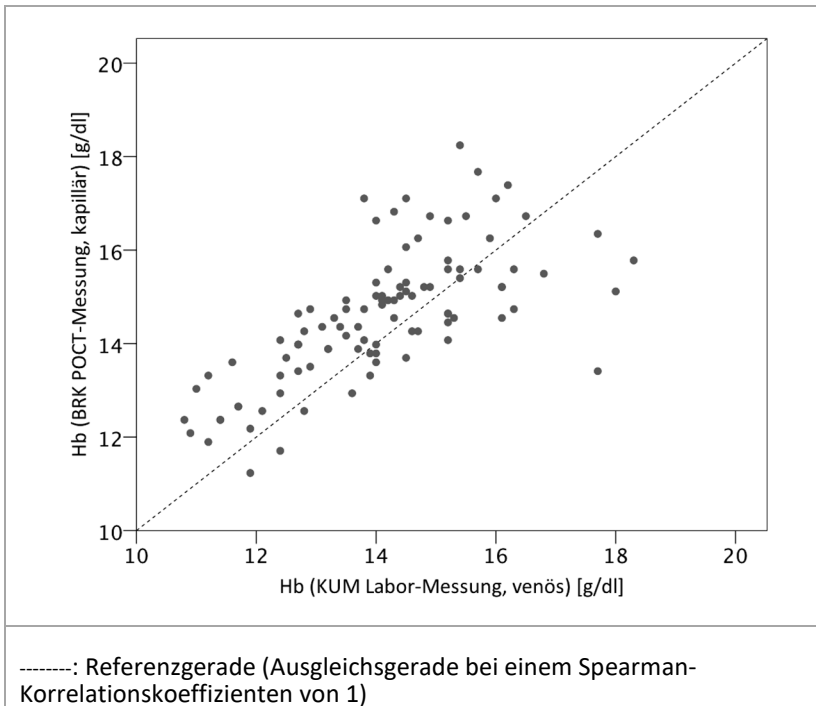


Abb. 17: Korrelation: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) zu Hb (KUM Labor-Messung, venös)

Spearman-Rho-Korrelation: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) zu Hb (KUM Labor-Messung, venös)	Korrelationskoeffizient	0,755
	Signifikanz	p<0,001

Tab. 12: Korrelation: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) zu Hb (KUM Labor-Messung, venös)

3.3.2 ZnPP (faseroptische Messungen, LMU-LFL) in Gegenüberstellung zu ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor)

Da die faseroptischen Messungen als innovative Messmethode geprüft werden sollen, wurden die erhobenen Werte der faseroptischen ZnPP-Bestimmung (faseroptische Messungen, LMU-LFL) jeweils mit den Ergebnissen der etablierten HPLC-Messung (HPLC-Messung, Volkmann Labor) verglichen. Durch den Wilcoxon-Test konnte ein signifikanter Unterschied für alle Wertepaare widerlegt werden, wie Tabelle 13 zu entnehmen. Es lag zudem entsprechend Tabelle 14 eine signifikante Korrelation für alle Wertepaare vor. Dieses Ergebnis ist in den untenstehenden Abbildungen 18 und 19 dargestellt. Darin sind für den eindrücklicheren Vergleich ebenfalls die Grafiken für die Gegenüberstellung von ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) und ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor) enthalten, die im nachfolgenden Abschnitt genauer beschrieben werden.

Eine signifikante Übereinstimmung zwischen den Messergebnissen aus den faseroptischen Messungen (LMU-LFL) und der HPLC-Messung (Volkmann Labor) konnte für alle faseroptischen Messmethoden, insbesondere die neu angewendete Schlauch-Messung belegt werden. Erstmals konnte dadurch gezeigt werden, dass eine nicht-invasive ZnPP-Bestimmung durch den Blutentnahmeschlauch möglich ist und der HPLC-Referenz ähnliche Werte liefert.

Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) – ZnPP (faseroptische Messung, LMU-LFL)	Küvetten- Messung	Lippen- Messung	Schlauch- Messung
Positive Ränge [n]	53	55	49
Negative Ränge [n]	46	44	44
Asymptotische Signifikanz	p=0,9	p=0,7	p=0,9

Tab. 13: Differenz: ZnPP (faseroptische Messungen, LMU-LFL) – ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor), Wilcoxon Test

Spearman-Rho-Korrelation: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) zu ZnPP (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL)	Korrelationskoeffizient	0,938
	Signifikanz	p<0,001
Spearman-Rho-Korrelation: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) zu ZnPP (faseroptische Lippen-Messung, LMU-LFL)	Korrelationskoeffizient	0,854
	Signifikanz	p<0,001
Spearman-Rho-Korrelation: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) zu ZnPP (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL)	Korrelationskoeffizient	0,938
	Signifikanz	p<0,001

Tab. 14: Korrelation: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) zu ZnPP (faseroptische Messungen, LMU-LFL)

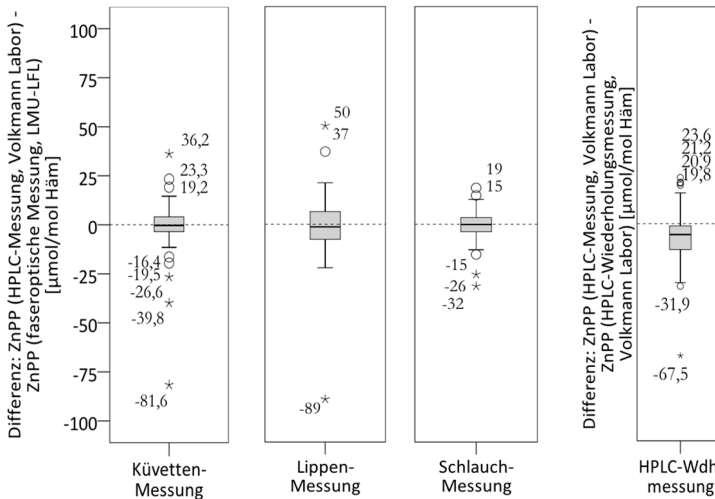


Abb. 18: Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) – ZnPP (übrige ZnPP-Messmethoden), Box-Whisker-Plot

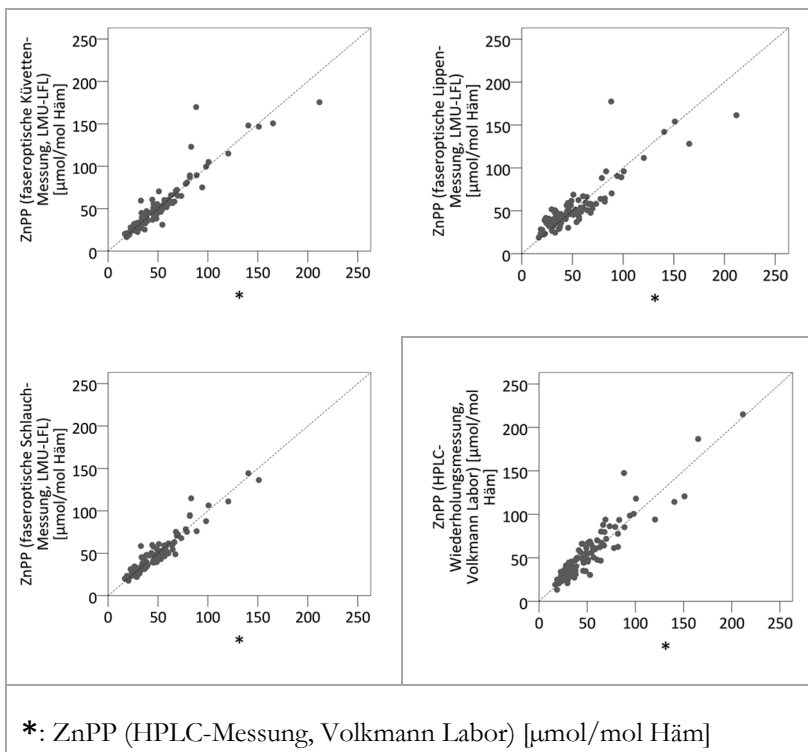


Abb. 19: Korrelation: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) zu ZnPP (übrige ZnPP-Messmethoden)

Für die anderen, bereits erprobten faseroptischen Messmethoden, die Lippen-Messung sowie die Küvetten-Messung, hat sich die erwartete hohe Korrelation zur HPLC-Messung bestätigt. Bei Betrachtung der zentralen Tendenzen fielen allerdings bei allen Messungen Ausreißer mit hoher Abweichung von bis zu 81 (Küvetten-Messung), 89 (Lippen-Messung) und 32 (Schlauch-Messung) µmol ZnPP/mol Häm im Vergleich zur HPLC-Messung auf. Bei der Zuordnung der Probanden nach Eisenmangelstadien kam es damit aufgrund der Ausreißer gegenüber der HPLC-Messung zu einer veränderten Stadieneinteilung. Als Ausreißer wurden alle Messwerte definiert, die außerhalb des 1,5 fachen Interquartilabstandes der jeweils untersuchten Stichprobe lagen. Die Ausreißer gegenüber der HPLC-Referenz lagen

je nach Messmethode bei 3-8% der untersuchten Population. Das heißt, bei 3-8% der Probanden lagen die faseroptisch ermittelten ZnPP-Werte außerhalb der 95% LoA bei Vergleich mit der HPLC-Messung. Inwieweit sich dies auf die Praktikabilität der Messungen und deren Nutzen in der Praxis auswirkt, wird im Rahmen der nachfolgenden Auswertungen zur diagnostischen Güte untersucht.

3.3.3 ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) in Gegenüberstellung zu ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor)

Als Basis für die Beurteilung der faseroptischen ZnPP-Bestimmung (LMU-LFL) in Gegenüberstellung zur etablierten HPLC-Messung (Volkmann Labor), wird letztere im Folgenden genauer analysiert. Es wurde dafür eine zweite ZnPP-Bestimmung an venösem EDTA-Vollblut mittels HPLC-Messung unter denselben Bedingungen durchgeführt (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor). Dies sollte dazu dienen, die Güte der HPLC-Bestimmung als Referenz besser beurteilen zu können und schließlich einen Bezugspunkt für die spätere Interpretation der Unterschiede zwischen den Messmethoden zu schaffen.

Die genannten Untersuchungen ergaben bei signifikanter positiver Korrelation eine ebenfalls signifikante Mittelwertdifferenz mit vorwiegend höheren Ergebnissen der HPLC-Wiederholungsmessung (Volkmann Labor). Die Daten und Illustrationen zu den erfolgten Berechnungen sind in den untenstehenden Tabellen 15 und 16 sowie den oben angeführten Abbildungen 18 und 19 zusammengefasst.

Es zeigte sich eine signifikante Abweichung in der zentralen Tendenz mit mittlerer Effektstärke. 6% der Messungen waren Ausreißer mit einer Abweichung von bis zu 68 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$, ähnlich wie beim Vergleich zwischen HPLC-Messung und faseroptischen Messungen mit 3-8%. Die Abweichung in der zentralen Tendenz zwischen HPLC-Messung (Volkmann Labor) und HPLC-Wiederholungsmessung (Volkmann Labor) übertraf die Abweichung zwischen faseroptischen Messungen und HPLC-Messung deutlich. So zeigte sich für die Differenz zwischen HPLC-Messung und

faseroptischen Messungen ein maximaler mittlerer Unterschied von -0,8 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$. Mit dem geringsten Standardfehler von 0,8 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ stach die Schlauch-Messung durch eine besonders geringe Wertepaarendifferenz heraus. Zwischen HPLC-Messung und HPLC-Wiederholungsmessung hingegen lagen im Mittel -6,4 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ bei einem Standardfehler von 1,3 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$.

Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) – ZnPP (HPLC- Wiederholungsmessung, Volkman Labor)	Positive Ränge [n]	79
	Negative Ränge [n]	20
	Asymptotische Signifikanz Z=-5,089 (negative Ränge)	p<0,001
	Errechnete Effektstärke [•] (basierend auf negativen Rängen)	r=0,511 ($ (-5,089/\sqrt{99}) $)
([•]): $r = (Z/\sqrt{n}) $		

Tab. 15: Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) – ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkman Labor), Wilcoxon-Test

Spearman-Rho-Korrelation: ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) zu ZnPP (HPLC- Wiederholungsmessung, Volkman Labor)	Korrelationskoeffizient	0,910
	Signifikanz	p<0,001

Tab. 16: Korrelation, ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) zu ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkman Labor)

Die Beurteilung der zentralen Tendenz der verschiedenen Messmethoden weist auf eine hohe Beziehung zwischen den faseroptischen Messergebnissen (LMU-LFL) und der HPLC-Messung (Volkman Labor) und auf hohe Variabilität der HPLC-Messung als Referenzmethode hin. Da die Betrachtung von Differenzen und Korrelation alleine Fehlinterpretationen nicht ausschließen und wie

bereits erwähnt keinen Beweis für die Übereinstimmung der Messmethoden erbringen kann [36], folgt für den Methodenvergleich eine Analyse nach Bland und Altman.

3.4 Übereinstimmung der Messmethoden

Die untenstehenden Analysen nach Bland und Altman enthalten Teile der klinischen Interpretation und greifen in Abschnitten der Diskussion vor. Dennoch wurden sie in der vorliegenden Arbeit dem Ergebnisteil zugeordnet, um bereits vor der Interpretation einen Überblick über die Ergebnisse des Methodenvergleichs bieten zu können, der einen essentiellen Teil dieser Arbeit darstellt.

3.4.1 Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) in Gegenüberstellung zu Hb (KUM Labor-Messung, venös)

Der Hinweis aus der Analyse der zentralen Tendenz konnte für die kapilläre Hb-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär) und die venöse Hb-Bestimmung (KUM Labor-Messung, venös) bestätigt werden. Die Bland-Altman-Analyse ergab einen signifikanten, negativen t-Wert. Genauer konnte der Unterschied als konstant systematischer Messfehler ohne proportional Bias (Beta nicht signifikant) beschrieben werden (Anhang 3). Die untenstehende Abbildung 20 zeigt, dass die 95% LoA zwischen 1,6 und -3,2 g/dl lagen. In 68% der Fälle lagen die LoA weiterhin zwischen 0,5 und -2,0 g/dl (Anhang 3). Damit kann die Aussage über die Defizite der kapillären Hb-Messung (BRK POCT-Messung, kapillär) näher eingegrenzt werden. Bei über zwei Drittel der Probanden wurden kapilläre Werte gemessen, die um maximal +/- 1,2 g/dl von der venösen Referenzmessung (KUM Labor-Messung, venös) abwichen. In Grenzfällen war die Fehleinteilung damit immer noch wahrscheinlich, eine Gefährdung stark anämischer Patienten bestand jedoch nur für einen geringeren Prozentsatz der Spender. So wurde nur 1% bei einem Hb zugelassen, der weiter als 1 g/dl unter der Anämiegrenze lag.

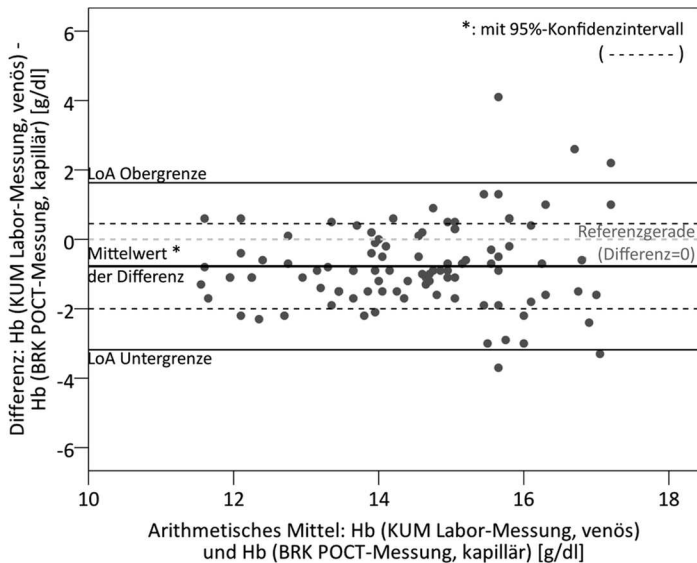


Abb. 20: Übereinstimmung: Hb (KUM Labor-Messung, venös) und Hb (BRK POCT-Messung, kapillär), Bland-Altman-Plot

Zu beachten ist, dass durch die alleinige Hb-Bestimmung lediglich eine Unterscheidung zwischen gesunden Probanden und Probanden mit Eisenmangelanämie getroffen werden kann. Ein beginnender Eisenmangel wird nicht erfasst. Aufgrund dieser fehlenden Graduierung bedarf es einer höheren Präzision der Diagnostik. Auch geringe Abweichungen vom wahren Wert, wie oben zu finden, sind bei der Erhebung des Hb-Wertes daher kritisch zu betrachten.

3.4.2 ZnPP (faseroptische Messungen, LMU-LFL) in Gegenüberstellung zu ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor)

Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse aus der ZnPP-Bestimmung konnten hohe Korrelationen aller faseroptischen Messmethoden (faseroptische Messungen, LMU-LFL) gegenüber der HPLC-Methode (HPLC-Messung, Volkmann Labor) belegt werden.

Im Folgenden sollen nun die Übereinstimmung geprüft und systematische Fehler ausgeschlossen werden.

3.4.2.1 Faseroptische Küvetten-Messung (LMU-LFL)

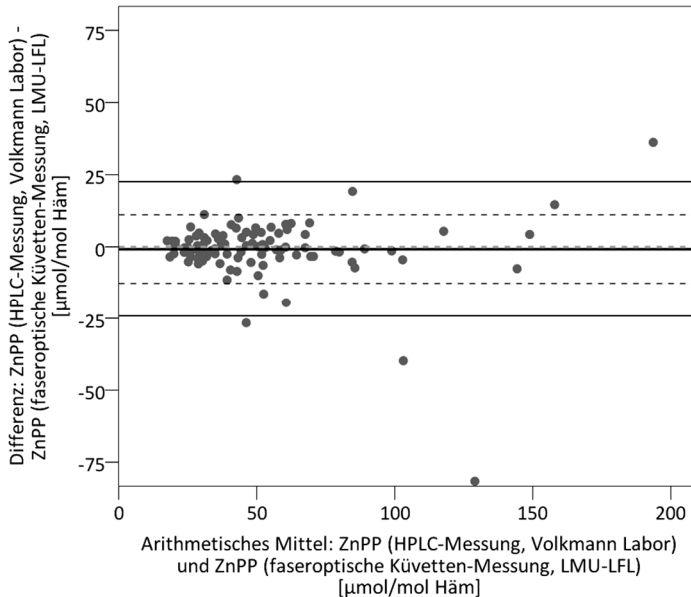


Abb. 21: Übereinstimmung: ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) und ZnPP (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL), Bland-Altman-Plot

Durch die fehlende Signifikanz des t-Wertes und des Regressionskoeffizienten Beta (Beta), konnten systematische Fehler sowie proportional Bias bei Gegenüberstellung von HPLC-Messung (Volkman Labor) und Küvetten-Messung (LMU-LFL) zunächst ausgeschlossen werden (Anhang 3). Die LoA zeigen in Abbildung 21, dass 95% der Differenzen zwischen der HPLC- und der Küvetten-Messung zwischen $-24,6$ und $22,6$ $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ lagen. Bei einer ZnPP-Differenz zwischen den Eisenmangelstadien von 30 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ (80 - 50 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$) könnte es dabei zur Fehleinordnung um maximal ein Eisenmangelstadium kommen. Die LoA für 68% der Werte lagen zwischen $-12,7$ und $11,1$ $\mu\text{mol/mol Häm}$ (Anhang 3). Auch bei Betrachtung der Differenzen innerhalb einer

Standardabweichung war eine Unsicherheit von +/- einem Krankheitsstadium damit gegeben. Probanden an der Grenze zur eisendefizitären Erythropoese konnten bei falsch niedrigem Wert den Graubereich zwischen 40 und 50 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ unterschreiten. Es könnte somit dazu kommen, dass Probanden, die laut HPLC-Messung unter eisendefizitärer Erythropoese leiden durch die faseroptische Messung an der Küvette nicht sicher als mindestens grenzwertig eisendefizitär erkannt wurden. Allerdings konnte der Test sicher gewährleisten, dass alle besonders gefährdeten Spender mit Eisenmangelanämie sicher als geringstenfalls eisendefizitär erkannt wurden und damit mindestens hätten aufgeklärt und beobachtet werden können.

3.4.2.2 Faseroptische Lippen-Messung (LMU-LFL)

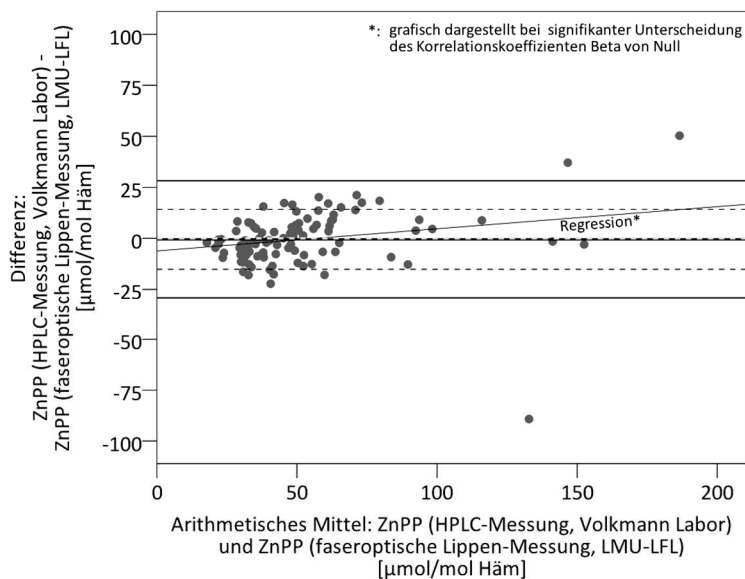


Abb. 22: Übereinstimmung: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) und ZnPP (faseroptische Lippen-Messung, LMU-LFL), Bland-Altman-Plot

Bei der Untersuchung der Übereinstimmung zwischen HPLC-Messung (Volkman Labor) und faseroptischer Lippen-Messung (LMU-LFL) überschritten die LoA von -29,2 und 28,3 $\mu\text{mol/mol}$ Häm auch hier nicht die ZnPP-Differenzen zwischen den Eisenmangelstadien, wie aus Abbildung 22 ersichtlich. Die 68% LoA lagen bei -15,1 und 14,2 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ (Anhang 3). Insgesamt konnte die Lippen-Messung das Eisenmangelstadium des Probanden damit ebenfalls mit einer Abweichung von maximal +/- einem Eisenmangelstadium bestimmen. Wie bei der Küvetten-Messung (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL) könnte dadurch sichergestellt werden, dass ein Eisenmangel bei allen Spendern mit Eisenmangelanämie (Eisenmangelstadium III) erkannt würde. Eine Fehleinschätzung als gesund bei vorliegender IDE (Eisenmangelstadium II) könnte erneut nicht ausgeschlossen werden.

Für die faseroptische Lippen-Messung ergab sich ein signifikant positives Beta nahe Null (Anhang 3), das auf ein proportional Bias mit höherer positiver Differenz zwischen den Messmethoden bei höheren Messwerten hindeuten kann. D.h. bei höheren Messwerten fielen die ZnPP-Werte aus der Lippen-Messung verhältnismäßig niedriger aus. Ein Confounder, wie derselbe Studienort oder Durchführung durch denselben Untersucher konnte bei den falsch niedrigen Werten nicht gefunden werden.

Bei der Interpretation dieses Ergebnisses ist zu beachten, dass die Fallzahlen in der vorliegenden Studie im Bereich hoher Werte sehr gering waren. Bei Betrachtung von Abbildung 22 fällt zudem auf, dass der Trend im Bereich hoher Werte maßgeblich von Ausreißern bestimmt wird. Es ist möglich, dass die geringe Anzahl von Probanden mit hohen ZnPP-Werten in Kombination mit den Extremwerten Ursache des vermeintlichen Bias waren. Um die Verlässlichkeit der transdermalen faseroptischen Messung bei hohen ZnPP-Werten genauer validieren zu können, wären Untersuchungsreihen mit diesbezüglich höheren Fallzahlen notwendig. In den vorliegenden Vergleichsstudien mit Untersuchung von 56 Frauen post partum [29] sowie 100 Kindern im Alter zwischen 9 Monaten und 5 Jahren [30] konnte kein proportional Bias bei der transdermalen Messung detektiert werden.

3.4.2.3 Faseroptische Schlauch-Messung (LMU-LFL)

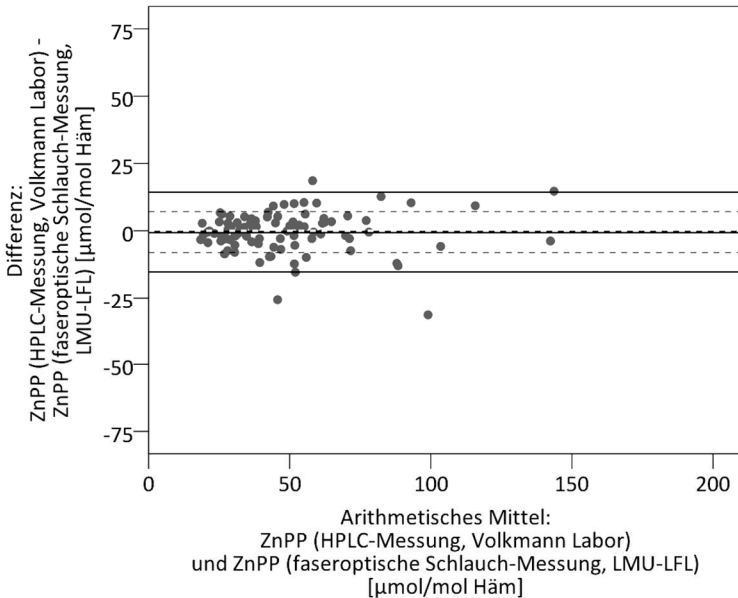


Abb. 23: Übereinstimmung: ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) und ZnPP (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL), Bland-Altman-Plot

Beim Vergleich von HPLC-Bestimmung (Volkman Labor) und Schlauch-Messung (LMU-LFL) ergab sich bei nicht signifikantem t und Beta kein Hinweis auf systematische Fehler oder proportional Bias (Anhang 3). Abbildung 23 zeigt, dass die 95% LoA mit Grenzen zwischen -15,3 und 14,4 µmol ZnPP/mol Häm erneut die ZnPP-Differenzen zwischen den Eisenmangelstadien unterschritten. Bei über zwei Drittel der durch den Blutentnahmeschlauch ermittelten Werte lag die Differenz zur HPLC-Messung zwischen -8,1 und 7,1 µmol ZnPP/mol Häm (Anhang 3). Damit lagen die LoA der hier erstmals getesteten faseroptischen Schlauch-Messung deutlich unterhalb der LoA der anderen faseroptischen Messungen. Die ZnPP-Bestimmung am Blutentnahmeschlauch konnte damit 95% der Probanden mit einer Varianz von maximal einem Eisenmangelstadium einteilen. Zusätzlich wurden 68% der Probanden, deren Erythropoese aufgrund der HPLC-Messung als eisendefizitär identifiziert wurde

durch die engen LoA noch im Graubereich zwischen 40-50 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ abgebildet. Gegenüber den anderen Messmethoden konnte die neuartige Messung am Blutentnahmeschlauch damit auch Probanden mit niedrigeren Eisenmangelstadien sicher als grenzwertig eisendefizitär erkennen.

3.4.3 ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) in Gegenüberstellung zur ZnPP (HPLC- Wiederholungsmessung, Volkmann Labor)

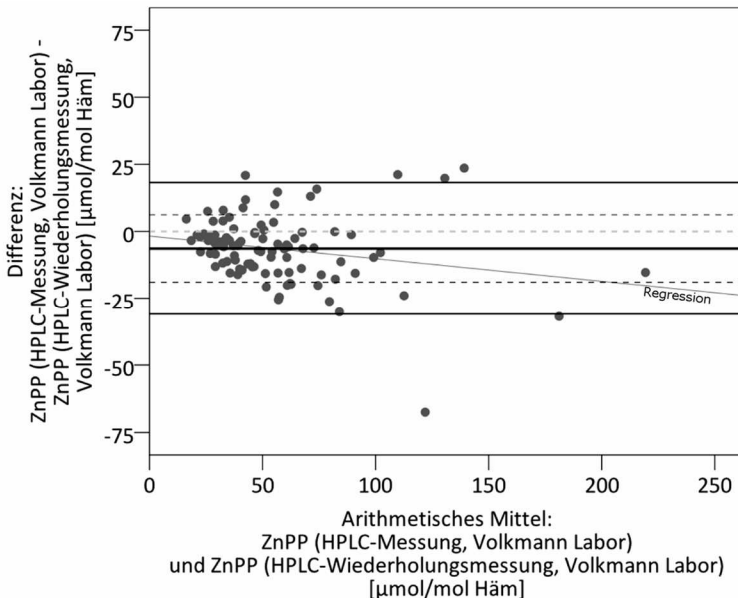


Abb. 24: Übereinstimmung: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) und ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor), Bland-Altman-Plot

Für die Interpretation der Bland-Altman-Plots wurde die HPLC-Messung (Volkmann Labor) als Referenz gewählt. Alle obenstehenden Analysen gehen davon aus, dass die ZnPP-Bestimmung mittels HPLC als verlässliche Messung vorausgesetzt werden kann. Bei der Untersuchung der HPLC-Wiederholungsmessung (Volkmann Labor-Wiederholungsmessung) zeigte sich jedoch, wie in Abbildung 24

veranschaulicht eine mittlere Differenz von $-6,4 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ mit dem Hinweis auf einen systematischen Fehler bei einem signifikanten t-Wert von $-5,1$ (Anhang 3).

Neben der genannten Abweichung zwischen den beiden Messungen deutet das signifikante negative Beta auf ein proportional Bias mit Tendenz zu negativen Differenzen bei höheren Messwerten hin (Anhang 3). Im Bereich hoher Werte fielen die zweiten HPLC-Messungen im Verhältnis zur ersten Messreihe höher aus. Ähnlich wie bei der Lippen-Messung ist das Bias gering und steht in Zusammenhang mit Ausreißern und geringen Fallzahlen. Die gemachten Beobachtungen bei der HPLC-Wiederholungsmessung sind daher in einer größeren Population systematisch und mit einer höheren Anzahl an Wiederholungsmessungen zu prüfen. Eine darauf folgende Varianzanalyse würde den Vergleich mit der in der Literatur angegebenen bereichsabhängigen Varianz des Verfahrens von 7 bis 10% [41] ermöglichen und somit gegebenenfalls eine genauere Einordnung der beschriebenen Ergebnisse erlauben.

Die 95% LoA der beiden HPLC-Messreihen lagen zwischen $-31,0$ und $18,2 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$, wie ebenfalls Abbildung 24 zu entnehmen ist. Damit ist die HPLC-Wiederholungsmessung die einzige Messung, deren ZnPP-Ergebnisse sich von der HPLC-Messung um mehr als ein Eisenmangelstadium unterscheiden konnten. Es konnte bei der HPLC-Wiederholungsmessung damit nicht ausgeschlossen werden, dass ein Proband, der aufgrund der ersten Messung als anämisch eingestuft wurde bei der zweiten Messung Werte von unter $50 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ erreicht und damit nur im Grenzbereich zur eisendefizitären Erythropoese abgebildet wurde. Die LoA für 68% lagen zwischen $-19,0$ und $6,2 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ (Anhang 3).

Für zwei Drittel der Probanden war damit eine Bestimmung des Eisenmangelstadiums mit einer Abweichung von +/- einem Eisenmangelstadium gewährleistet. Eine Fehleinschätzung als gesund bei vorliegender IDE (Eisenmangelstadium II) konnte wie bei der faseroptischen Küvetten- und Schlauch-Messung erneut nicht ausgeschlossen werden.

3.5 Diagnostische Güte

Um eine hohe Präzision der folgenden Analysen zu gewährleisten, wurden alle Probanden, deren Eisenmangel, wie unter 3.2 aufgeführt, nicht näher bezeichnet werden konnte, von den Untersuchungen zur diagnostischen Güte ausgeschlossen.

3.5.1 Hb-Messung

Die aktuell beim Blutspendedienst angewandte kapilläre Hb-Wert-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär) sollte bezüglich ihrer diagnostischen Güte analysiert werden, um den Nutzen anderer Methoden in Relation zur derzeitigen Praxis abschätzen zu können. Es wurde bereits festgestellt, dass eine signifikante Wertepaarendifferenz zwischen kapillären Hb-Werten (BRK POCT-Messung, kapillär) und venösen Hb-Werten (KUM Labor-Messung, venös) bestand. Daher erfolgte zur Betrachtung der klinischen Auswirkungen dieser Abweichung in Tabelle 17 eine Gegenüberstellung diagnostischer Gütekriterien. Für die Beurteilung der diagnostischen Güte wurden die vom BRK vorgeschriebenen Hb-Grenzwerte für die Spenderzulassung (Hb <12,5 g/dl für Frauen, Hb <13,5 g/dl für Männer) als Cutoff-Werte zugrundegelegt.

Erkennung von Eisenmangelanämie		
Hb-Messmethode	BRK POCT-Messung, kapillär [•]	KUM Labor-Messung, venös [•]
Sensitivität	43%	100%
Spezifität	97%	85%
LR ⁺	14	7
LR ⁻	0,6	0
Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie		
Hb-Messmethode	BRK POCT-Messung, kapillär [•]	KUM Labor-Messung, venös [•]
Sensitivität	19%	52%
Spezifität	97%	88%
LR ⁺	6	4
LR ⁻	0,8	0,5
(*) : Hb-Cutoff 12,5 g/dl bei Frauen und 13,5 g/dl bei Männern		

Tab. 17: Diagnostische Güte der Hb-Messmethoden

3.5.2 ZnPP-Bestimmung

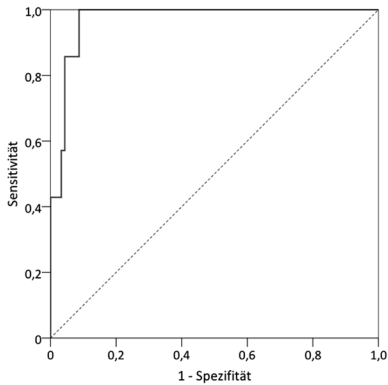
Die ROC-Analyse der HPLC-Messung (Volkman Labor) ergab entsprechend Tabelle 18 und Abbildung 25 einen idealen Cutoff bei 76 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ für die Erkennung einer Eisenmangelanämie und von 46 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ für die Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie. Der ermittelte Cutoff wurde zum Zweck der Vergleichbarkeit auf die faseroptischen Messungen in Tabelle 19 übertragen.

Für alle ZnPP-Messungen wurden auf Grundlage der berechneten Cutoffs wesentliche Parameter zur Beurteilung der diagnostischen Güte berechnet, die in Tabelle 19 dargestellt sind. Für die Erkennung von Eisenmangelanämie zeigten Küvetten- sowie Schlauch-Messung eine mindestens gleich hohe diagnostische Güte wie die HPLC-Messung. Die Lippen-Messung zeigte als einzige faseroptische Messung eine reduzierte Sensitivität von 71% gegenüber 100% bei HPLC-, Küvetten- und Schlauch-Messung. Für die Erkennung von IDE und

Eisenmangelanämie fand sich bei keiner der faseroptischen Messungen eine ebenso hohe diagnostische Güte wie durch die HPLC-Messung. Besonders die Schlauch-Messung ergab eine geringere Sensitivität von 78% gegenüber 91% bei der HPLC-Referenzmessung.

Als Vergleich wurde die diagnostische Güte anschließend unter Berücksichtigung der etablierten Cutoffs für Eisenmangelanämie (Eisenmangelstadium III) von 80 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ sowie für IDE (Eisenmangelstadium II) von 50 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ [27] analysiert und in Tabelle 20 dargestellt. Dadurch waren nachfolgend der Vergleich mit anderen Studien möglich, die sich derselben Cutoffs bedient hatten [29, 30].

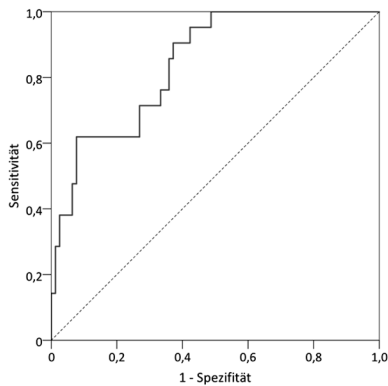
Erkennung von Eisenmangelanämie



Erkennung von Eisenmangelanämie

AUC	0,972
Standardfehler	0,017
Asymptotische Signifikanz	<0,001
Maximaler Youden-Index (Sensitivität+ Spezifität-1) bei einem Cutoff von	76 [•]
Sensitivität	100%
Spezifität	93%

Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie



Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie

AUC	0,857
Standardfehler	0,042
Asymptotische Signifikanz	<0,001
Maximaler Youden-Index (Sensitivität+ Spezifität-1) bei einem Cutoff von	46 [•]
Sensitivität	91%
Spezifität	67%

([•]): [$\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$]

Abb. 25/Tab. 18: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor), ROC-Analyse

Erkennung von Eisenmangelanämie, Cutoff 76*				
ZnPP-Messmethode	HPLC-Messung	Küvetten-Messung	Lippen-Messung	Schlauch-Messung
Sensitivität	100%	100%	71%	100%
Spezifität	93%	94%	94%	95%
LR ⁺	14,3	16,7	11,8	20
LR ⁻	0	0	0,3	0
Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie, Cutoff 46*				
ZnPP-Messmethode	HPLC-Messung	Küvetten-Messung	Lippen-Messung	Schlauch-Messung
Sensitivität	91%	82%	86%	78%
Spezifität	67%	63%	60%	61%
LR ⁺	2,8	2,2	2,2	2,0
LR ⁻	0,1	0,3	0,2	0,4
(*) : [µmol ZnPP/mol Häm]				

Tab. 19: Diagnostische Güte der ZnPP-Messmethoden auf Grundlage errechneter Cutoffs

Erkennung von Eisenmangelanämie, Cutoff 80*				
ZnPP-Messmethode	HPLC-Messung	Küvetten-Messung	Lippen-Messung	Schlauch-Messung
Sensitivität	86%	86%	71%	50%
Spezifität	94%	94%	94%	95%
LR ⁺	14	14	12	10
LR ⁻	0,1	0,1	0,3	0,5
Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie, Cutoff 50*				
ZnPP-Messmethode	HPLC-Messung	Küvetten-Messung	Lippen-Messung	Schlauch-Messung
Sensitivität	71%	71%	67%	67%
Spezifität	69%	67%	74%	71%
LR ⁺	2	2	3	2
LR ⁻	0,4	0,4	0,4	0,5
(*) : [µmol ZnPP/mol Häm]				

Tab. 20: Diagnostische Güte der ZnPP-Messmethoden auf Grundlage etablierter Cutoffs [27]

3.6 Hb-Wert Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär)

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sollen eine Festlegung des Vorhersagewertes der ZnPP-Messungen ermöglichen. Dafür wurde auf die kapillären Hb-Werte der Probanden bei der nachfolgenden Spende (BRK POCT-Folgemessung, kapillär) zugegriffen. Diese konnten dann, wie untenstehend beschrieben in Abhängigkeit vom ZnPP-Wert (HPLC-Messung, Volkmann Labor) am Studientag untersucht werden. In Annahme eines hohen Vorhersagewertes der ZnPP-Messung wurde bei den Studienteilnehmern mit hohem ZnPP-Wert am Studientag mit einem Hb-Wert-Abfall bei der Folgemessung (BRK POCT-Folgemessung, kapillär) gerechnet.

Im Hb-Wert Follow-up zeigte sich, wie aus Abbildung 26 hervorgeht, insgesamt ein Hb-Wert-Abfall innerhalb der Studienpopulation am Tag der Folgespende. Beim Vergleich von kapillärem Hb-Wert und

kapillärem Follow-up Hb-Wert am Tag der Folgespende ergab sich, wie Tabelle 21 zu entnehmen eine signifikante Korrelation der erhobenen Werte auf dem 1%-Niveau. Tabelle 22 zeigt zudem, dass beim t-Test eine auf dem 1%-Niveau signifikante Differenz zwischen dem Hb-Wert am Studientag (BRK POCT-Messung, kapillär) und dem Hb-Wert am Tag der Folgespende (BRK POCT-Folgemessung, kapillär) errechnet werden konnte.

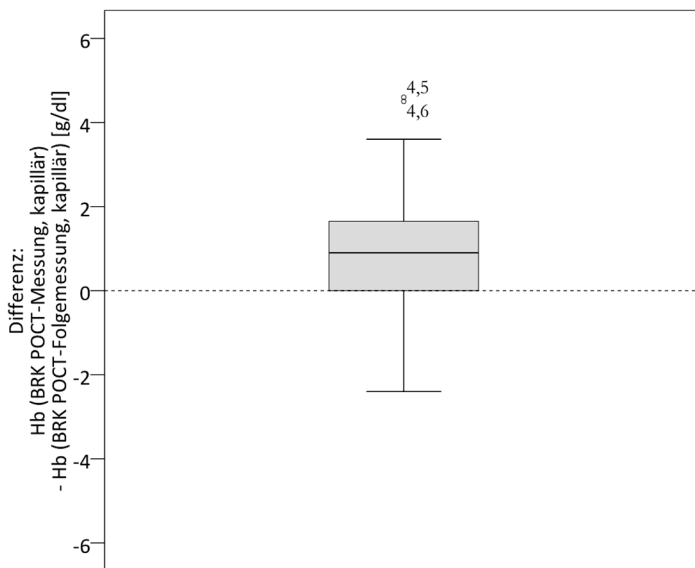


Abb. 26: Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT-Folgemessung, kapillär), Box-Whisker-Plot

Korrelation: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) zu Hb (BRK POCT-Folgemessung, kapillär)	Korrelation nach Pearson	0,527
	Signifikanz	p<0,001

Tab. 21: Korrelation: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) zu Hb (BRK POCT-Folgemessung, kapillär)

Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) zu Hb (BRK POCT-Folgemessung, kapillär)	T	6,177
	Signifikanz	p<0,001
	Errechnete Effektstärke [•]	d=0,572 ((14,045-14,903)/1,4998)
^(•) : $d = (m_2 - m_1) / sd_1 $		

Tab. 22: Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT-Folgemessung, kapillär), t-Test

Anschließend erfolgte die Betrachtung der kapillären Hb-Werte bei der Follow-up Untersuchung (BRK POCT-Folgemessung, kapillär) in Abhängigkeit von den ZnPP-Werten am Studentag (HPLC-Messung, Volkmann Labor). Es wurden dafür zwei Subgruppen gebildet. Die Probanden, deren Hb-Wert infolge der Spende gesunken war, wurden den Probanden mit gestiegenem Hb-Wert infolge der Spende gegenübergestellt. Tabelle 23 zeigt eine auf dem 5%-Niveau signifikante Mittelwertdifferenz zwischen diesen beiden Subgruppen im Mann-Whitney-U-Test. Die ZnPP-Werte (HPLC-Messung, Volkmann Labor) derjenigen, die einen kapillären Hb-Wert-Abfall bei der Folgespende erfuhren lag dabei signifikant niedriger.

Unter den Studienteilnehmern mit Hb-Wert-Abfall bei der Folgespende zeigte die HPLC-Messung lediglich in 27,3% der Fälle eisendefizitäre Erythropoese (Eisenmangelstadium II) oder Eisenmangelanämie (Eisenmangelstadium III) an, wie Abbildung 27 veranschaulicht. Unter den Probanden mit Hb-Wert-Anstieg waren es entsprechend Abbildung 28 62,5%.

	ZnPP bei Hb-Differenz >0 im Follow-up [●]	ZnPP bei Hb-Differenz ≤0 im Follow-up [■]
N	64	24
Mittlerer Rang	40	55
Z	-2,413	
Signifikanz	p=0,016	
Errechnete Effektstärke [▲]	r=0,257 (-2,413/√88)	
<p>(●): gesunkene Hb-Werte im Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär)</p> <p>(■): gestiegene Hb-Werte im Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär)</p> <p>(▲): $(r = Z/\sqrt{n})$</p>		

Tab. 23: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) gruppiert nach gesunkenen/gestiegenen Hb-Werten im Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär), Mann-Whitney-U-Test

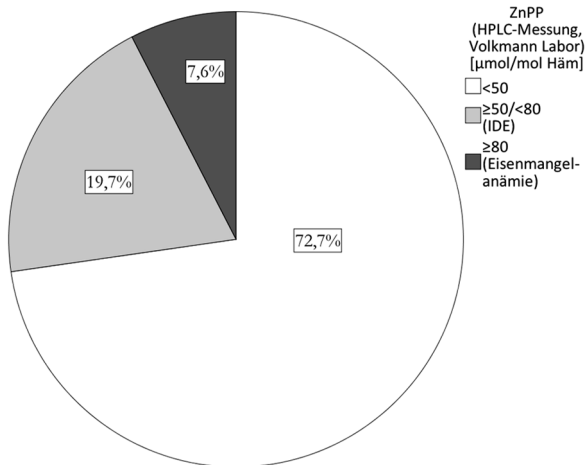


Abb. 27: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) aller Studienteilnehmer mit gesunkenen Hb-Werten im Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär)

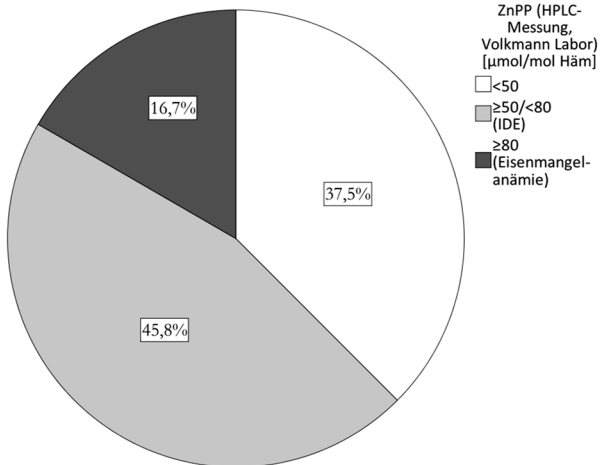


Abb. 28: ZnPP (HPLC-Messung, Volkmann Labor) aller Studienteilnehmer mit gestiegenen Hb-Werten im Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär)

4 Diskussion

4.1 Studienpopulation

Aus dem Jahresbericht des Blutspendedienstes des BRK 2017 geht hervor, dass unter den Blutspendern in Bayern im Studienjahr 45% Frauen und 55% Männer waren. Das Durchschnittsalter betrug bei den Frauen 40 und bei den Männern 43 Jahre [22]. Das Studienpopulationsprofil zeigt damit eine bezüglich der Geschlechterverteilung ähnliche Zusammensetzung aus 40% Frauen und 60% Männern. Mit einem Mittelwert des Probandenalters von 46 (Frauen) und 51 Jahren (Männer) lag dieser über dem statistischen Wert des BRK. Diese Tatsache ist dem Selektionsbias geschuldet. In die Studie wurden nur regelmäßige Blutspender eingeschlossen. Da ältere Spender häufiger spenden [21], war ein erhöhter Altersmittelwert im Rahmen der Probandenauswahl zu erwarten.

4.2 Eisenmangelprävalenz in der Studienpopulation

Die Prävalenz von Eisenmangel lag unter den untersuchten Studienteilnehmern bei 53%. Insgesamt zeigten 26% erschöpfte Eisenspeicher (Eisenmangelstadium I), 14% eisendefizitäre Erythropoese (Eisenmangelstadium II) und 7% Eisenmangelanämie (Eisenmangelstadium III). Um die Wertung dieser Daten zu erleichtern, ist ein Vergleich mit anderen Gruppen sinnvoll. Die bereits eingangs erwähnten Referenzstudien aus den USA [1] und Dänemark [2] sollen die Einordnung der Studienergebnisse unter Berücksichtigung der Studiendurchführung ermöglichen.

Bei 4-6 Spenden innerhalb von zwei Jahren konnten Cable et. al. [1] bei 59% der Studienteilnehmer eisendefizitäre Erythropoese nachweisen. Es wurde dabei von IDE ausgegangen, wenn der Logarithmus des Quotienten aus sTfR und Ferritin bei mindestens 2,07 lag. Der lösliche Transferrinrezeptor wurde mittels Tina-quant Assay bestimmt. Erschöpfte Eisenspeicher wurden durch einen Ferritinwert von unter 12 ng/ml definiert. In Bezug auf das Geschlecht zeigte sowohl die vorliegende Studie, wie auch die Vergleichsstudie aus den USA eine

ähnliche Verteilung. Männer und Frauen litten in der US-Studie in 18% und 27% unter erschöpften Eisenspeichern [1] gegenüber 24% und 30% in der vorliegenden Studie. Fortgeschrittener Eisenmangel zeigte sich bei der Untersuchung in den USA deutlich häufiger. 47% der Männer und 60% der Frauen litten unter eisendefizitärer Erythropoese oder Eisenmangelanämie [1], wohingegen die aktuelle Datenerhebung nur eine Prävalenz von 22% für Männer und 20% für Frauen ergab. Das Risiko für eine Anämie ist bei Frauen im gebärfähigen Alter erhöht [5]. Als Ursache für die höhere Prävalenz von fortgeschrittenem Eisenmangel unter den weiblichen Teilnehmern der US-Studie wäre daher ein jüngeres weibliches Probandenkollektiv im Vergleich zur vorliegenden Studie denkbar. Bei sehr ähnlicher Altersverteilung unter den Frauen beider Studien konnte dies jedoch keine Erklärung liefern. So gab es in der untersuchten Studienpopulation und der US-Studie 23% und 21% Frauen im Alter von unter 40 Jahren, sowie 20% und 23% im Alter zwischen 41 und 50 Jahren [1]. Allerdings wurde die Spendenhäufigkeit in der Vergleichsstudie stärker kontrolliert. Im Jahr vor Studienstart wurden von allen Studienteilnehmern bereits mindestens zwei Blutspenden gefordert. Die maximale Spendehäufigkeit lag damit bei Frauen bei sechs gegenüber vier Spenden. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Prävalenz und die Werteabweichung bei den Männern gibt zusätzlich der niedrigere Hb-Wert-Cutoff in der US-Studie. Eine Ablehnung von der Blutspende erfolgte bei beiden Geschlechtern erst bei einem Hb von unter 12,5 g/dl [1], wodurch die Eisenspeicher bei Männern stärker beansprucht wurden. Demgegenüber wurden männliche Spender bei der vorliegenden Studie bereits bei einem Hb-Wert von unter 13,5 g/dl abgelehnt.

Bei 5280 dänischen Spendern [2] zeigte sich eine Eisenmangelprävalenz von maximal 27,4%. Dieser Wert wurde bei Männern unter Betrachtung der Hepcidin-Werte ermittelt. Frauen litten bei Untersuchung der Hepcidin-Werte in 24,7% der Fälle unter Eisenmangel. Dieser wurde bei einer Hepcidin-Konzentration von unter 0,5 nmol/l angenommen [2]. Die Hepcidin-Bestimmung erfolgte mittels Kombination aus Ionenaustauschchromatographie und

Flugzeitmassenspektrometrie. Als Studienpopulation dienten hier Blutspender ohne Selektion der besonders gefährdeten regelmäßigen Blutspender [2]. Da das Risiko an Eisenmangel zu leiden bei wiederholten Spenden steigt, ist die negative Abweichung gegenüber der vorliegenden Studienpopulation nicht verwunderlich.

Obwohl keine optimale Vergleichsstudie mit identischen Ein- und Ausschlusskriterien vorlag, kann dennoch die Aussage getroffen werden, dass die vorliegende Studie die Hinweise aus weiteren Studien [1, 2] zum Hochrisikoprofil regelmäßiger Blutspender bestätigt.

Ein Vergleich mit Daten aus der Normalbevölkerung unterstreicht diese Aussage. Der Schwerpunktbericht der Gesundheitsberichterstattung des Bundes zur Gesundheit von Frauen und Männern im mittleren Lebensalter [42] vereint unter anderem Daten aus den ersten repräsentativen gesamtdeutschen Untersuchungen der Bundes-Gesundheitssurveys 1998 sowie Informationen aus Arbeitsunfähigkeits- und Krankenhausstatistiken. Die Ergebnisse zeigen eine Periodenprävalenz für Eisenmangel bei Personen zwischen 30 und 44 Jahren von 31,9% für Frauen und 4,0% für Männer [42]. Im Alter von 45-64 Jahren lag die Periodenprävalenz bei 21% für Frauen und 3,5% für Männer [42]. Demgegenüber liegen die durch die vorliegende Studie erhobenen Werte zur Prävalenz für beide Geschlechter deutlich höher.

Auf die genauere Betrachtung der Eisenmangelprävalenz in verschiedenen Altersgruppen wurde in der hier vorliegenden Untersuchung verzichtet, da die Gruppenstärken mit maximal 35 Probanden einer Altersgruppe und maximal 20 Probanden eines Eisenmangelstadiums innerhalb der Gruppierung sehr gering waren. Derart geringe Fallzahlen würden mit einer mangelnden Trennschärfe weiterer Analysen einhergehen. Erwähnenswert ist jedoch der Hinweis auf erhöhte Prävalenz von Eisenmangelanämie unter jüngeren Probandinnen. In der hier vorliegenden Studienpopulation litten 5,0% der Frauen unter 40 Jahren unter einer Eisenmangelanämie im Vergleich zu 0-1,7% in allen übrigen Altersgruppen. Die Tatsache, dass ausschließlich in der jüngsten Altersgruppe der Frauen keine

Probandin ohne Eisenmangel war, spiegelt die erhöhte Periodenprävalenz für Eisenmangel bei jungen Frauen wider.

4.3 Zentrale Tendenz

4.3.1 Hb (BRK POCT-Messung, kapillär)

in Gegenüberstellung zu Hb (KUM Labor-Messung, venös)

Beim Vergleich der Ergebnisse aus der kapillären (BRK POCT-Messung, kapillär) und venösen (KUM Labor-Messung, venös) Hb-Wert-Bestimmung ergab sich eine signifikante Abweichung zwischen den Messmethoden mit mittlerer Effektstärke.

Die venösen Hb-Werte lagen im Mittel -0,8 g/dl unter den kapillären Hb-Werten, was sich wie bereits beschrieben auf Sensitivität und Spezifität des Tests auswirkte.

In der Literatur finden sich vorwiegend bestätigende, aber vereinzelt auch widerlegende Studien zu dieser Feststellung [43-46]. Beispielsweise bei einer Untersuchung an 150 Vollblutspendern am Department of Transfusion Medicine an den National Institutes of Health in den USA [44] zeigte die kapilläre photometrische Messung ebenfalls signifikant höhere Werte gegenüber der venösen photometrischen Messung bei einer Mittelwertdifferenz von 0,43 g/dl [44]. Verwendet wurde das Gerät HemoCue Hb 201+ (HemoCue AB, Angelholm, Sweden) für die kapilläre Messung sowie Cell-Dyn 4000 (Abbott Labs, Abbott Park, IL, USA) für die venöse Messung [44]. Auch an der Federal University of Santa Catarina in Brasilien wurden kapilläre und venöse Messungen einander gegenübergestellt (n=426) [45]. Hier ergaben sich höhere kapilläre Hb-Werte mit einer Mittelwertdifferenz von 0,6 g/dl unter Verwendung des HemoCue-Messgerätes (HemoCue AB, Angelholm, Sweden) [45]. Als Referenz diente hier die venöse Messung unter Verwendung des Gerätes Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) [45]. Eine andere Untersuchung zeigte unter Verwendung von CompoLab Hb (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) und Sysmex KX21n (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) den gegenteiligen Effekt [46]. Bei Messungen an 351 Vollblutspendern in der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Köln lagen die kapillären Werte mit einer

Mittelwertdifferenz von -0,53 g/dl niedriger und führten zu vermehrter Ablehnung von Blutspendern [46]. Eine Bestätigung, dass die kapilläre Hb-Bestimmung jedoch gegenüber der venösen Hb-Bestimmung in der Mehrzahl der Studien höhere Werte generiert, wird durch eine Metaanalyse von Whitehead et al. zur Methodik der Hb-Testung unter Labor- und Feldbedingungen belegt [43]. Bei Untersuchung von 18 Studien zeigte die kapilläre Hb-Testung in 12 Fällen höhere Werte [43]. Es kamen in den Studien, die dieser Metaanalyse [43] zugrunde liegen Geräte diverser Hersteller und Messmethoden zum Einsatz.

Die oben aufgezeigte Variabilität der Ergebnisse bei Vergleich zwischen kapillärer (BRK POCT-Messung, kapillär) und venöser (KUM Labor-Messung, venös) Hb-Messung können womöglich darauf zurückgeführt werden, dass die kapilläre Hb-Wert-Bestimmung sehr labil gegenüber veränderten Messbedingungen ist. Die Messgenauigkeit des in der vorliegenden Studie verwendeten Gerätes CompoLab TM (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) wird im Messbereich von 1,8 g/dl bis 25,4 g/dl mit $\pm 1,3\%$ angegeben. Jedoch ist bei jeder Messung eine Verfälschung des Wertes, die nicht durch die Messtechnik bedingt ist, möglich. So kann der Messwert zum Beispiel durch Kontamination mit Gewebsflüssigkeit bei fehlender Verwerfung des ersten Blutstropfens oder durch Quetschen der Punktionsstelle bei der Entnahme niedriger ausfallen [47]. Schlecht durchblutete Extremitäten, beispielsweise bei kalten Temperaturen, können zu einem langsamen kapillären Blutfluss führen. In einem solchen Fall wird häufig eine Massage der Punktionsstelle durchgeführt, um den Blutfluss anzuregen, was bereits zu falsch negativen Hb-Werten bei der kapillären Messung führen kann [47]. In Zusammenschau der Informationen aus der Literaturrecherche lässt sich feststellen, dass die kapilläre Messung starken Schwankungen unterliegt und bei der Mehrheit der Untersuchungen höhere Werte als die venöse Hb-Messung hervorbringt [43]. Damit stößt die kapilläre Messung bei der präzisen Spenderselektion an ihre Grenzen.

In Vorausschau auf die Analysen zur diagnostischen Güte soll an dieser Stelle ergänzend gezeigt werden, dass mithilfe der venösen Messung eine Zulassung von Spendern mit Eisenmangelanämie verhindert werden könnte. Dies konnte die kapilläre Messung im Rahmen der

vorliegenden Studie nicht leisten, wie Abbildung 29 zu entnehmen ist. Durch Ausreißer mit bis zu 3,7 g/dl Differenz könnten unter den gegebenen Voraussetzungen in Einzelfällen sogar stark anämische Patienten zugelassen werden. Beispielsweise wäre die Zulassung einer weiblichen Spenderin mit einem venösen Hb-Wert (KUM Labor-Messung, venös) von 8,8 g/dl möglich gewesen, wenn im Falle eines Ausreißers ein falsch hoher Wert von 12,5 g/dl diagnostiziert worden wäre. In Zusammenschau mit der Abweichung der zentralen Tendenz lässt sich damit feststellen, dass zum Studienzeitpunkt ein Defizit in der Spenderselektion bestand.

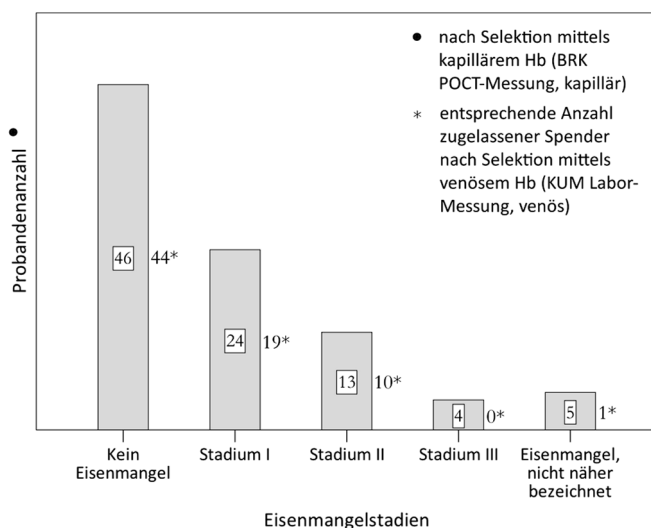


Abb. 29: Eisenmangel unter den zugelassenen Spendern nach Selektion mittels Hb

Dabei ist zu beachten, dass in der vorliegenden Studie 90% der kapillären Hb-Werte (BRK POCT-Messung, kapillär) durch Punktion am Ohrläppchen ermittelt wurden. Eine Umstellung auf Messung durch Punktion der Fingerbeere erfolgte durch das BRK ab Dezember 2017. Die Hb-Wert-Bestimmung aus Kapillarblut der Fingerbeere generiert niedrigere und damit der venösen Messung ähnlichere Werte [48] und soll damit die Spenderauswahl verbessern. Diese Annahme konnte in der vorliegenden Studie durch die diesbezügliche

Untersuchung der Probanden mit Punktion der Fingerbeere und durch den Vergleich mit den Hb-Werten bei Punktion des Ohrläppchens unterstützt werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Fallzahl mit 10 Probanden, deren Hb-Wert durch Punktion der Fingerbeere bestimmt wurde sehr gering war und der Vergleich damit wenig aussagekräftig ist.

Bei Vergleich der Ergebnisse der Hb-Wert-Bestimmungen aus Kapillarblut der Fingerbeere (BRK POCT-Messung, kapillär aus Fingerbeere) und aus Kapillarblut des Ohrläppchens (BRK POCT-Messung, kapillär aus Ohrläppchen) fiel auf, dass die Hb-Wert-Bestimmung aus Kapillarblut der Fingerbeere der venösen Messung ähnlichere Werte liefert. So zeigten sich bei der Hb-Wert-Bestimmung aus Kapillarblut der Fingerbeere (BRK POCT-Messung, kapillär aus Fingerbeere) um im Mittel $-0,7$ g/dl niedrige Werte (Anhang 2) gegenüber der venösen Hb-Messung (KUM Labor-Messung, venös), wie Abbildung 30 veranschaulicht. Bei Einbezug der Studienteilnehmer mit Messung aus Kapillarblut des Ohrläppchens (BRK POCT-Messung, kapillär aus Ohrläppchen) lag die venöse Hb-Messung im Vergleich $-0,8$ g/dl niedriger, wie im Abschnitt 3.3.1 im Detail dargestellt.

Bei Vergleich der Messwerte ohne Bezug zur venösen Hb-Bestimmung entsprechend Abbildung 31 lag die Mittelwertdifferenz zwischen den Hb-Werten bei Messung am Ohrläppchen (BRK POCT-Messung, kapillär aus Ohrläppchen) und den Hb-Werten bei Messung an der Fingerbeere (BRK POCT-Messung, kapillär aus Fingerbeere) bei $0,7$ g/dl (Anhang 2) mit niedrigen Werten bei Wahl der Fingerbeere als Punktionsort.

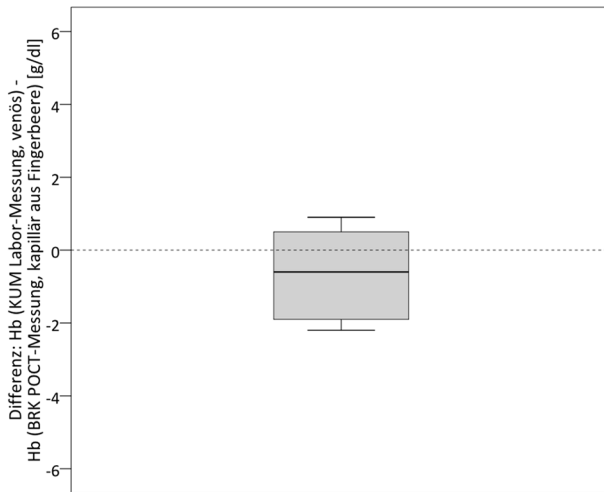


Abb. 30: Differenz: Hb (KUM Labor-Messung, venös) – Hb (BRK POCT-Messung, kapillär aus Fingerbeere), Box-Whisker-Plot

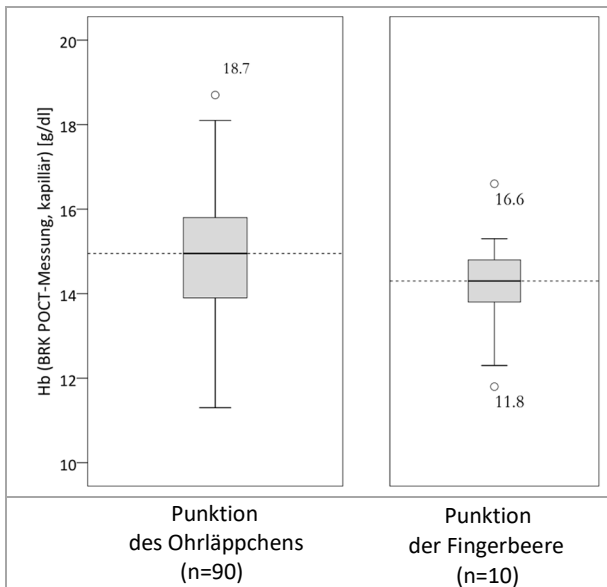


Abb. 31: Hb-Werte (BRK POCT-Messung, kapillär) unterteilt nach Punktionsort, Box-Whisker-Plot

4.4 Diagnostische Güte

Obwohl der Hb-Wert nicht vorgibt Mittel zur Selektion von Patienten mit Vorstufen der Eisenmangelanämie zu sein, wird er bei den Analysen zur Erkennungsfähigkeit von IDE dennoch vergleichend betrachtet, um die klinische Relevanz der Ergebnisse aus der faseroptischen Messreihe beurteilen zu können. Alle im folgenden Text dieses Abschnitts genannten Werte nehmen Bezug auf die in Tabelle 24 und 25 dargestellten Daten.

4.4.1 Hb-Messung

Wie die Ergebnisse aus der Analyse der kapillären Hb-Werte (BRK POCT-Messung, kapillär) der Studienteilnehmer in Zusammenschau mit deren Eisenstatus zeigen konnten, war die POCT-Messung ein gutes Instrument zur Erkennung gesunder, spendebereiter Personen. Bei Screening auf Eisenmangelanämie wurden 96% der Gesunden erkannt, bei Screening auf Eisenmangelanämie oder eisendefizitäre Erythropoese 97% der Gesunden. Problematisch ist jedoch die mangelnde Erkennungsfähigkeit von Personen mit Eisenmangel. Nur 43% derjenigen mit Eisenmangelanämie wurden durch den Test erkannt. Da der Hb-Wert erst bei Eisenmangelanämie absinkt und sich bei eisendefizitärer Erythropoese noch im Normbereich befindet, sinkt die Sensitivität bei der Suche nach Probanden mit Eisenmangelanämie oder eisendefizitärer Erythropoese auf 19% ab. Die Wahrscheinlichkeit, dass Personen mit eisendefizitärer Erythropoese zur Spende zugelassen wurden lag bei der aktuellen Screeningmethode durch POCT-Messung bei 81%. Damit wurden die Eisenspeicher der Betroffenen weiter beansprucht. Eine Vollblutspende führt zu einem Eisenverlust von etwa 250 mg [24]. Dies entspricht mindestens 25% der durchschnittlichen Eisenspeicher eines Mannes und mindestens 62,5% der durchschnittlichen Eisenspeicher einer prämenopausalen Frau [24]. Bei bereits erschöpften Speichern erhöht eine Spende damit die Regenerationszeit und kann zu einem relevanten Absinken des Hb-Wertes mit klinischen Symptomen führen. Die Entwicklung einer Eisenmangelanämie mit Unterschreitung der Hb-Wert-Grenzen ist dabei durchaus möglich. Abgesehen von damit verbundenen gesundheitlichen Nachteilen für den Spender, besteht damit auch das

Risiko der Reduktion der Spendebereitschaft bei Spendern mit entsprechenden Symptomen infolge der Spende.

Erkennung von Eisenmangelanämie				
Hb-Cutoff 12,5/13,5 [●]				
Hb-Messmethode	BRK POCT-Messung, kapillär	KUM Labor-Messung, venös		
Sensitivität	43%	100%		
Spezifität	97%	85%		
LR ⁺	14	7		
LR ⁻	0,6	0		
ZnPP-Cutoff 80*				
ZnPP-Messmethode	HPLC-Messung	Küvetten-Messung	Lippen-Messung	Schlauch-Messung
Sensitivität	86%	86%	71%	50%
Spezifität	94%	94%	94%	95%
LR ⁺	14	14	12	10
LR ⁻	0,1	0,1	0,3	0,5
ZnPP-Cutoff 76*				
ZnPP-Messmethode	HPLC-Messung	Küvetten-Messung	Lippen-Messung	Schlauch-Messung
Sensitivität	100%	100%	71%	100%
Spezifität	93%	94%	94%	95%
LR ⁺	14,3	16,7	11,8	20
LR ⁻	0	0	0,3	0
(*) : [µmol ZnPP/mol Häm]				
(●) : 12,5 g/dl bei Frauen und 13,5 g/dl bei Männern				

Tab. 24: Methodenvergleich Diagnostische Güte, Erkennung von Eisenmangelanämie

Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie				
Hb-Cutoff 12,5/13,5 [●]				
Hb-Messmethode	BRK POCT-Messung, kapillär	KUM Labor-Messung, venös		
Sensitivität	19%	52%		
Spezifität	97%	88%		
LR ⁺	6	4		
LR ⁻	0,8	0,5		
ZnPP-Cutoff 50*				
ZnPP-Messmethode	HPLC-Messung	Küvetten-Messung	Lippen-Messung	Schlauch-Messung
Sensitivität	71%	71%	67%	67%
Spezifität	69%	67%	74%	71%
LR ⁺	2	2	3	2
LR ⁻	0,4	0,4	0,4	0,5
ZnPP-Cutoff 46*				
ZnPP-Messmethode	HPLC-Messung	Küvetten-Messung	Lippen-Messung	Schlauch-Messung
Sensitivität	91%	82%	86%	78%
Spezifität	67%	63%	60%	61%
LR ⁺	2,8	2,2	2,2	2,0
LR ⁻	0,1	0,3	0,2	0,4
(*): [$\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$] (●): 12,5 g/dl bei Frauen und 13,5 g/dl bei Männern				

Tab. 25: Methodenvergleich Diagnostische Güte, Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie

Wie bereits eingangs thematisiert, reduziert eine Ablehnung von der Blutspende aufgrund der Daten der Voruntersuchung die Wahrscheinlichkeit erneut zu spenden [10]. Daher wäre die Erkennung einer eisendefizitären Erythropoese (Eisenmangelstadium II)

notwendig, um eine Anämie (Eisenmangelstadium III) zu verhindern und die Spendebereitschaft zu bewahren. Dass Anämiepatienten keinesfalls spenden sollten ist selbstverständlich und kann bei einer Sensitivität der aktuell angewandten Messmethode von 43% in der Studienpopulation nicht ausgeschlossen werden.

Demgegenüber zeigte die venöse Hb-Wert-Bestimmung (KUM Labor-Messung, venös) bessere Ergebnisse. Die deutlich höhere Sensitivität von 100% für die Erkennung von Patienten mit Anämie stellte einen großen Vorteil der venösen Hb-Messung dar. Dies geschah zu Lasten der Spezifität, sodass die Anzahl der abgelehnten Spender im Vergleich zur kapillären Hb-Testung von 8% auf 26% der Studienpopulation anstieg. Obwohl es aus ethischer Sicht höherrangig wichtig ist, Spender mit Eisenmangel vor einer Spende zu bewahren, muss auch hier erwähnt werden, dass übermäßige, unnötige Ablehnungen zum Erhalt der Spendebereitschaft zu vermeiden sind, sodass die venöse Messung im Hinblick darauf schlecht abschneidet. Ebenso wie die POCT-Messung gelingt es auch bei der venösen Hb-Wert-Bestimmung nicht, frühe Eisenmangelstadien zu erkennen. Nur 52% der Personen in Stadium II wurden erfolgreich erkannt. Eine deutliche Verbesserung der Spenderselektion wäre durch die venöse Bestimmung dennoch anzunehmen, da sie gegenüber der kapillären Messung eine um 33 %-Punkte höhere Sensitivität für die Erkennung von eisendefizitärer Erythropoese und Eisenmangelanämie aufweist. Es ist allerdings zu beachten, dass dafür gegenüber dem kapillären Hb-POCT bereits vor der Blutspende eine invasivere venöse Punktion nötig wäre. Nachteilig ist dabei der höhere präanalytische Aufwand. Gegenteilig verhält sich die kapilläre Hb-Wert-Bestimmung. Sie ist schnell und unkompliziert verfügbar, bringt dafür aber höhere Messwertschwankungen mit sich.

4.4.2 ZnPP-Bestimmung

Die mithilfe der ROC-Analyse ermittelten idealen Cutoffs für die HPLC-Messung (Volkman Labor) lagen in der vorliegenden Studie jeweils 4 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ unter den etablierten Cutoffs. Dies entspricht einer Abweichung von 5% für die Erkennung einer Eisenmangelanämie und 8% für die Erkennung von IDE und

Eisenmangelanämie. Bei einer Rundung der Nachkommastellen der ermittelten Cutoffs auf zwei Stellen deckten sich die berechneten und etablierten Cutoffs.

Die Area under the curve (AUC) aus den berechneten ROC-Kurven ergab für die Erkennung von Eisenmangelanämie einen Wert von 0,97 bei der HPLC-Messung (Volkman Labor-Messung) sowie 0,98 für die Küvetten-Messung, 0,96 für die Lippen-Messung und 0,95 für die Schlauch-Messung. Damit ist für alle faseroptischen Methoden (LMU-LFL, faseroptische Messung) eine exzellente Differenzierung [49] zwischen bestehender und nicht vorhandener Anämie bestätigt. Besonders zeichnete sich die Schlauch-Messung mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 95% gefolgt von der Küvetten-Messung mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 94% aus. Bei der Lippen-Messung blieb die Sensitivität auf 71% beschränkt, jedoch bei einem überzeugenden positiven Wahrscheinlichkeitsverhältnis von 12. Insgesamt zeigten die faseroptischen Messmethoden für die Erkennung von Eisenmangelanämie beim gewählten idealen Cutoff von 76 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ eine um 28-57% bessere Sensitivität verglichen mit der kapillären Hb-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär) und konnten eine Eisenmangelanämie ebenso gut erkennen, wie die venöse Hb-Bestimmung (KUM Labor-Messung, venös) und die HPLC-Messung (Volkman Labor-Messung).

Für die Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie ergaben sich AUC-Werte von 0,86 für die HPLC-Messung (Volkman Labor) und 0,83 für die Küvetten-Messung, 0,77 für die Lippen-Messung und 0,82 für die Schlauch-Messung. Damit war auch für die Erkennung von IDE eine gute Differenzierung bei der ZnPP-Messung mittels HPLC (Volkman Labor-Messung) sowie eine angemessene bis gute Stadiendifferenzierung [49] mithilfe der innovativen Messmethoden (faseroptische Messungen, LMU-LFL) gegeben. Auch hier zeigte die Küvetten-Messung die höchste diagnostische Güte mit der Lippen-Messung an zweiter Stelle. Die Werte für Sensitivität und Spezifität lagen gegenüber der Erkennung einer Eisenmangelanämie niedriger. Jedoch war die Potenz der faseroptischen Messungen für die

Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie beim errechneten Cutoff von 46 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ mit der HPLC-Messung gleichauf. Die Sensitivität der faseroptischen Messungen (LMU-LFL) übertraf die der venösen Hb-Bestimmung (KUM Labor-Messung, venös) um 26-34%. Die Sensitivität gegenüber der kapillären Hb-Messung (BRK POCT-Messung, kapillär) lag sogar um 59-67% höher.

Die Berechnung der idealen Cutoffs für die HPLC-Messung wurde vorgenommen, um bei der Gegenüberstellung der Methoden die HPLC-Messung als idealen Bezugspunkt festzulegen. Bei errechnetem gegenüber etabliertem Cutoff ergab sich, wie zu erwarten, eine höhere diagnostische Güte. Ob sich diese in einer zweiten Studienpopulation reproduzieren ließe, bleibt offen.

Insgesamt zeigte sich bei Berücksichtigung der berechneten Cutoffs die oben genannte geringe Differenz von Sensitivität und Spezifität der faseroptischen Messungen zu Sensitivität und Spezifität der HPLC-Messung (Volkman Labor) und eine deutlich überlegene Sensitivität gegenüber der derzeit angewandten kapillären Hb-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär).

In Anbetracht des abweichenden Ergebnisses bei der HPLC-Wiederholungsmessung kann die HPLC-Messung als ideale Referenz in Frage gestellt werden. Neben einer Unsicherheit auf Seiten der Messtechnik ist zu überlegen, ob eine fehlerhafte Präanalytik Ursache der veränderten Werte bei der zweiten Messung sein kann. Alle EDTA-Vollblutproben wurden vor der HPLC-Analyse zur Freisetzung des ZnPP eingefroren. Eine Arbeitsgruppe am Institute for Low Temperature Science an der Universität Hokkaido konnte feststellen, dass die Geschwindigkeit der Abkühlung Auswirkung auf die prozentualen Anteil hämolysierter roter Blutkörperchen sowie deren Zellmorphologie im gefrorenen Zustand hat [50]. Da alle Blutproben am Institut für Laboratoriumsmedizin der LMU unter streng kontrollierten Bedingungen eingefroren wurden, ist eine starke Abweichung aufgrund der Präanalytik diesbezüglich unwahrscheinlich. Ein anderer beeinflussender Faktor könnte grundsätzlich die Lichtempfindlichkeit von ZnPP darstellen. Alle EDTA-Proben wurden jedoch nach dem Pipettieren in lichtgeschützten Behältern

transportiert, die vom oben genannten Institut bereitgestellt wurden. Auch in diesem Fall ist die Differenz durch fehlerhafte Behandlung der Proben nicht erklärlich. Bei einer Vergleichsstudie, welche die transdermale faseroptische Messung an 100 Kindern im Alter zwischen 9 Monaten und 5 Jahren getestet hat, ergab sich ebenfalls eine hohe Differenz bei wiederholten HPLC-Messungen an denselben Blutproben. Die Differenz zwischen HPLC-Messung und HPLC-Wiederholungsmessung wurde dort mit $-10 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ angegeben [30].

Aufgrund der beschriebenen Abweichung bei der HPLC-Wiederholungsmessung (Volkman Labor) wurde für alle weiteren Betrachtungen die Verwendung der etablierten Cutoffs gegenüber den berechneten Cutoffs auf Basis der HPLC-Referenz bevorzugt. Der Grenzwert für IDE von $50 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ entspricht dem Grenzwert des MVZ Labors PD Dr. Volkman und Kollegen GbR, welches die ZnPP-Analysen der vorliegenden Studie durchgeführt hat. Dieser Cutoff, sowie der Cutoff für die Feststellung einer Eisenmangelanämie von $80 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ fanden in den bereits zitierten Studien Anwendung und ermöglichten somit einen Vergleich mit bereits gemachten Beobachtungen.

Den obenstehenden Tabellen 24 und 25 können zur vollständigen Übersicht die diagnostischen Parameter bei etabliertem und mittels ROC-Analyse berechnetem idealem Cutoff entnommen werden.

Für die Erkennung von Eisenmangelanämie bei einem Cutoff von $80 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ zeigten die faseroptische Küvetten-Messung und die HPLC-Messung eine identische diagnostische Güte. Die Lippen-Messung ergab demgegenüber eine reduzierte Sensitivität von 71%. Die faseroptische Schlauch-Messung konnte Eisenmangelanämie beim etablierten Cutoff von $80 \mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ mit einer Sensitivität von 50% nur unzuverlässig erkennen. Hervorzuheben ist jedoch, dass alle faseroptischen Methoden (LMU-LFL) erneut eine höhere Sensitivität als die kapilläre Messung (BRK POCT-Messung, kapillär) beweisen konnten. Die Differenz lag bei 7%-Punkten bis 43%-Punkten. Bei LR⁺-Werten von über 10 wurde durch alle Verfahren eine hohe Posttestwahrscheinlichkeit bei

positivem Testergebnis erreicht. Die invasiven Methoden der HPLC- und Küvetten-Messung erreichten eine hohe diagnostische Güte ohne Einschränkungen bei zusätzlich niedrigem LR⁻ von 0,1.

Auffällig war der Sensitivitätsabfall der Schlauch-Messung (LMU-LFL, faseroptisch) von 100 auf 50% bei angepasstem gegenüber etabliertem Cutoff. Dieser Effekt kann auf die geringe Fallzahl an Probanden (n=4) mit Eisenmangelanämie bei der Messung am Blutentnahmeschlauch zurückgeführt werden. Eine Veränderung der Einteilung weniger Probanden kann bei geringer Prävalenz zu einer starken Veränderung der Sensitivität und damit zur Ergebnisverzerrung führen. Ergänzende Parameter, wie das Wahrscheinlichkeitsverhältnis können in diesem Fall zur Korrektur der Einschätzung beitragen. Im vorliegenden Fall deutet die hohe LR⁺ von 10 darauf hin, dass positive Testergebnisse die Posttestwahrscheinlichkeit deutlich erhöhen. Damit relativiert sich die Aussage über die Unzulänglichkeit der faseroptischen Schlauch-Messung bei einem Cutoff von 80 µmol ZnPP/mol Häm. Auch die Aussagen über die reduzierte Sensitivität der kapillären Hb-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär) sowie der faseroptischen Lippen-Messung sind bei einer LR⁺ von 14 und 12 kritisch zu betrachten. Es ist anzunehmen, dass die Sensitivität der kapillären Hb-Messung und der genannten faseroptischen Messungen bei höherer Fallzahl höher liegen würden, da weniger Einfluss durch Grenzfälle bestünde.

Insgesamt zeigten alle faseroptischen Messmethoden für die Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie bei einem Cutoff von 50 µmol ZnPP/mol Häm reduzierte Sensitivitäten gegenüber der reinen Erkennung von Eisenmangelanämien. Für die Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie erreichten die HPLC-Messung (Volkman Labor-Messung) und die erneut ebenbürtige faseroptische Küvetten-Messung (LMU-LFL, faseroptisch) mit 71% die höchste Sensitivität. Beide nicht-invasiven Messungen (Lippen-Messung und Schlauch-Messung) wichen mit einer Sensitivität von 67% ebenfalls kaum von der HPLC-Messung ab. Zunächst lassen diese Daten darauf schließen, dass eine exakte Erkennung der Probanden mit IDE und Eisenmangelanämie bei einer Sensitivität von unter 80% durch keine der Messmethoden gewährleistet werden kann. Verglichen mit der

derzeit zur Verfügung stehenden kapillären Hb-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär) zeigten die faseroptischen Messungen (LMU-LFL, faseroptisch) jedoch eine um mindestens 48%-Punkte erhöhte Sensitivität. Dieser Unterschied kann für den Schutz einzelner Spender entscheidend sein, da gegenüber der derzeit angewendeten kapillären Hb-Messung zusätzliche Spender mit Eisenmangel erkannt werden könnten. Je mehr Spender von ihrem Eisenmangel erführen, desto mehr Spender könnten auch vor negativen Auswirkung geschützt werden. Wie denkbare Schutzmaßnahmen sich gestalten könnten, wird weiter unten diskutiert.

Bei Betrachtung der Daten zu Sensitivität und Spezifität fällt weiterhin auf, dass die diagnostische Güte der Küvetten-Messung der HPLC-Messung gleichkommt. Diese Feststellung gilt unabhängig vom Cutoff und vom zu detektierenden Eisenmangelstadium und zeugt von einer hohen Verlässlichkeit der faseroptischen Messtechnik. Der Grund für die geringere diagnostische Güte der nicht-invasiven Messungen (Lippen-Messung und Schlauch-Messung) scheint daher im Bereich der Störfaktoren zu liegen, welche bei der Küvetten-Messung nicht gegeben sind.

Bei den UV-Einmalküvetten, die für die ZnPP-Bestimmung an pipettiertem EDTA-Vollblut verwendet wurden, handelt es sich um ein Material, das auf die Durchlässigkeit von Licht ausgerichtet ist. Dies ist weder bei einem Blutentnahmeschlauch, noch bei der individuell pigmentierten Haut eines Probanden der Fall. Inhomogenitäten des Schlauches und Verunreinigungen der Unterlippe oder Lippenstift können den Lichttransport derart individuell verändern, dass falsch negative Werten generiert werden.

Zusammenfassend konnten die obenstehenden Untersuchungen zeigen, dass die faseroptische Küvetten-Messung (LMU-LFL, faseroptisch) bezüglich ihrer diagnostischen Güte der HPLC-Messung (Volkmann Labor-Messung) entspricht. Die Abweichung der beiden Messmethoden lag bei maximal 2%-Punkten in der Spezifität. Neben der hohen Verlässlichkeit der Küvetten-Messung ist hervorzuheben, dass alle faseroptischen ZnPP-Messungen (LMU-LFL) besser für die Detektion von Eisenmangelanämie sowie

IDE geeignet waren, als das eingesetzte kapilläre POCT (BRK POCT-Messung, kapillär). Die ebenfalls als POCT verfügbare faseroptische Lippen-Messung und Schlauch-Messung könnten die Sensitivität für die Erkennung von Eisenmangelanämie bei der Spenderselektion um 7%-28%-Punkte anheben. Für die Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie wäre eine um 48%-Punkte verbesserte Erkennung derjenigen mit Eisenmangel in Stadium II (IDE) und III (Eisenmangelanämie) möglich.

Trotz dieser Vorteile der faseroptischen Messungen gegenüber der kapillären Hb-Bestimmung bleibt die kapilläre Hb-Messung beim Blutspendedienst unabdingbar. Der Schutz der Spender erfordert auch den Ausschluss von Anämien, die nicht durch Eisenmangel bedingt sind, wie beispielsweise der Ausschluss einer durch Vitamin-B12-Mangel bedingten Anämie oder Anämie aufgrund von akuten Blutverlusten oder Erkrankungen des blutbildenden Systems. Dies kann die ZnPP-Bestimmung nicht leisten. Aufgrund dessen lag der Fokus beim Methodenvergleich nicht auf der Spezifität der faseroptischen Messungen, sondern auf deren Sensitivität. Bei nahezu idealer Erkennung gesunder Probanden durch den kapillären Hb-Wert in der vorliegenden Studie, war die Spezifität des ZnPP-Wertes als ergänzender Parameter zweitrangig. Zur Vervollständigung der Aussagen über die diagnostische Güte der neuartigen Messmethoden soll dennoch erwähnt sein, dass die Spezifität für die Erkennung derjenigen ohne Eisenmangelanämie bei 94% (Küvetten- und Lippen-Messung) und 95% (Schlauch-Messung) lag. Für den Ausschluss von IDE und Eisenmangelanämie ergaben sich für die faseroptischen Messungen Werte, die um maximal 5%-Punkte von der Spezifität der HPLC-Messung (Volkman Labor-Messung) abwichen.

Aus den vorliegenden Daten zur diagnostischen Güte der fünf verglichenen Messmethoden ergibt sich, dass der Einsatz der faseroptischen ZnPP-Bestimmungen (LMU-LFL, faseroptisch) als ergänzende Maßnahme hilfreich für die Spenderselektion sein könnte. Die höhere Sensitivität gegenüber der derzeit angewendeten kapillären Hb-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär) könnte

dazu beitragen, Spender mit Eisenmangel sicher zu erkennen und ihren Bedürfnissen entsprechend aufzuklären.

Um den Einsatz in der Praxis vorstellbar zu machen, soll im Folgenden gezeigt werden, wie sich die zusätzliche Anwendung der nicht-invasiven ZnPP-Messungen bei der Blutspende auf die Spenderselektion in der Studienpopulation ausgewirkt hätte. Besonders die faseroptische Schlauch-Messung ermöglicht eine praktikable Anwendung der Messungen ohne zusätzlichen Zeitaufwand während der Blutspende. Daher wurden die Ausführungen zur Bedeutung der faseroptischen ZnPP-Bestimmung für regelmäßige Blutspender in untenstehender Abbildung 32 auf diese Messmethode bezogen. Die Ergebnisse der Lippen-Messung sind zum Vergleich in dieselbe Abbildung miteinbezogen.

Ausgehend von der ersten Spenderselektion auf Basis der kapillären Hb-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär) erfolgte ein Ausschluss von sieben potentiellen Spendern (7% der Studienpopulation). Kein Spender ohne Eisenmangel wurde fälschlicherweise abgelehnt, was aufgrund der hohen Spezifität zu erwarten war. 57% der Probanden mit Eisenmangelanämie, 93% derjenigen mit eisendefizitärer Erythropoese und 88% derer mit sonstigem Eisenmangel (Stadium I mit erschöpften Eisenspeichern sowie nicht näher bezeichnetem Eisenmangel) wurden zugelassen. Damit erfolgte eine Spende mit weiterer Beanspruchung der Eisenspeicher. Auch bei vier bereits anämischen Probanden.

Um eine zu hohe Ablehnungsquote zu verhindern, wurde für die Skizzierung einer potentiellen Spenderselektion festgesetzt, dass Spender ab einem ZnPP-Wert von 50 $\mu\text{mol/mol}$ Häm zunächst über den bestehenden Eisenmangel aufgeklärt werden sollten. Erst ab 80 $\mu\text{mol ZnPP/mol}$ Häm sollte eine Aufklärung und begründete Ablehnung von der Spende erfolgen.

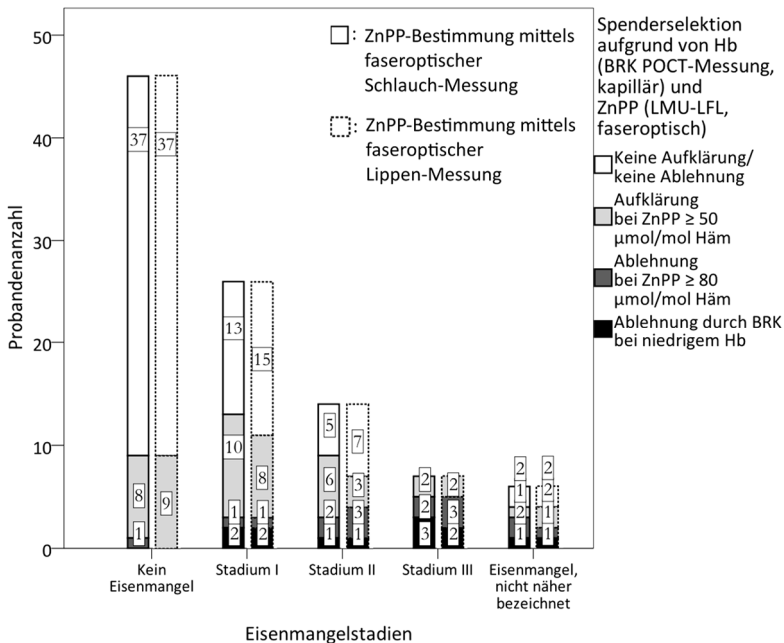


Abb. 32: Spenderselektion aufgrund von Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) und ZnPP (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL)

Bei einer Aufklärung aller Spender mit ZnPP-Werten über 50 µmol/mol Häm (Schlauch-Messung (LMU-LFL, faseroptisch)) wären, wie Abbildung 32 zu entnehmen ist 100% der Probanden mit Eisenmangelanämie (Stadium III), 62% derer mit eisendefizitärer Erythropoese (Stadium II) und 53% derjenigen mit sonstigem Eisenmangel (Stadium I und Eisenmangel, nicht näher bezeichnet) erreicht worden. 20% der Probanden ohne Eisenmangel wären fälschlicherweise informiert worden. Die Aufklärung hätte insgesamt 35 Spender umfasst.

Die Ablehnung aller potentiellen Spender mit ZnPP-Werten über 80 µmol/mol Häm (Schlauch-Messung (LMU-LFL, faseroptisch)) hätte einen Schutz von 71% der Probanden mit Eisenmangelanämie erreicht. Genauso wären 21% derjenigen mit eisendefizitärer Erythropoese und 19% derjenigen mit sonstigem Eisenmangel abgelehnt worden.

Insgesamt entspricht dies 15 abgelehnten Personen (15% der Studienpopulation). An dieser Stelle soll noch einmal genannt sein, dass Eisenmangel eine deutliche Beeinträchtigung für die betroffene Person bedeuten kann. Anhaltender Eisenmangel kann zu Schleimhautdefekten mit Schluckbeschwerden, Haarausfall, Kopfschmerzen, Konzentrationsschwierigkeiten, schneller Ermüdbarkeit bis hin zu depressiver Symptomatik und Atemnot führen. Obwohl die Verfügbarkeit von Blutprodukten von großer Bedeutung für die klinische Versorgung kritisch kranker Patienten ist, sollten derartige Nebenwirkungen für den Spender nicht in Kauf genommen werden.

Mithilfe der ZnPP-Bestimmung bestünde die Möglichkeit, einem bestehenden Eisenmangel bei Blutspendern durch umfangreiche Information gezielt entgegenzuwirken. Daher wurden die Spender mit sonstigem Eisenmangel hier nicht den fälschlicherweise zugelassenen Spendern zugeordnet. Irrtümlicherweise wären demnach 29% der Probanden mit Eisenmangelanämie zugelassen worden und 79% derjenigen mit eisendefizitärer Erythropoese. Obwohl diese Zahlen zunächst hoch scheinen, entspricht dies bereits einer relativen Risikoreduktion von 49% für Eisenmangelanämie und 15% für IDE gegenüber der kapillären Hb-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär). Zusätzlich zum reduzierten Risiko mit Eisenmangelanämie oder IDE zugelassen zu werden, muss beachtet werden, dass 42% dieser Zulassungen ebenfalls unter Aufklärung erfolgt wären. Die Folgen einer Spende trotz Eisenmangel wären dadurch bei vorausgesetzter Compliance möglicherweise milder ausgefallen.

Die Anzahl derjenigen, die ohne Aufklärung fälschlicherweise zugelassen worden wären, wäre deutlich gesenkt worden. Von 57% auf 0% bei den Probanden mit Eisenmangelanämie, von 93% auf 36% für diejenigen mit eisendefizitärer Erythropoese und von 88% auf 47% bei sonstigem Eisenmangel. Dies entspricht einer relativen Risikoreduktion von 100%, 61% und 47% bei Selektion durch zusätzliche Schlauch-Messung (LMU-LFL) gegenüber der alleinigen Selektion aufgrund kapillärer Hb-Werte (BRK POCT-Messung, kapillär). Es hätte damit gewährleistet werden können, dass alle Spender mit Eisenmangelanämie und 55% der Spender mit IDE mindestens die

Möglichkeit zum Selbstmanagement durch weiterführende Informationen erhalten hätten.

Es ist zu beachten, dass eine Zulassung anämischer Spender auch unter Aufklärung nicht akzeptabel ist, da eine erneute Spende einen weiteren Hb-Wert-Abfall hervorrufen und Anämiesymptome damit begünstigen kann. Trotz faseroptischer Messung wäre dies in zwei Fällen nicht vermeidbar gewesen.

An dieser Stelle soll zudem darauf hingewiesen sein, dass eine Ablehnung von der Spende bei ZnPP-Bestimmung am Blutentnahmeschlauch erst dann möglich wäre, wenn die Punktion bereits erfolgt und die Spende begonnen worden wäre. Dies bedeutet zum einen personellen Aufwand trotz Ablehnung des Blutspenders. Zum anderen kann die Ablehnung dadurch für den potentiellen Spender einen stärker abschreckenden Effekt haben als bei Ablehnung aufgrund der weniger invasiven kapillären Hb-Bestimmung. Abhilfe könnte diesbezüglich ein Ablehnungsmanagement schaffen, welches das Procedere bei Notwendigkeit einer Zurückweisung regelt. Denkbar wäre beispielsweise anstelle eines für den Spender frustrierenden Abbruchs der Spende eine Reduzierung der Spendemenge in Abhängigkeit vom ZnPP-Wert. Alternativ wäre die Ablehnung vor der Punktion durch die ZnPP-Bestimmung an der Unterlippe oder an der Küvette möglich, welche diesbezüglich im Vorteil liegen. Da die Hb-Wert-Bestimmung (BRK POCT-Messung, kapillär) weiterhin unentbehrlich wäre, um Anämien auszuschließen, die nicht durch Eisenmangel begründet sind, wäre für die ZnPP-Bestimmung an der Küvette keine zusätzliche kapilläre Punktion notwendig.

Die Ablehnungsquote hätte sich in der Studienpopulation aufgrund der faseroptischen Messung am Blutentnahmeschlauch (LMU-LFL, faseroptisch) mehr als verdoppelt. Eine persönliche Aufklärung dieser Probanden und der zusätzlichen 35% mit ZnPP-Werten über 50 $\mu\text{mol/mol}$ Häm wäre ebenfalls mit hohem personellem Aufwand verbunden. Es muss allerdings beachtet werden, dass es sich in der vorliegenden Studie um eine Population regelmäßiger Blutspender mit hoher Prävalenz fortgeschrittenen Eisenmangels handelt. In einer normalen Spenderpopulation wären

diesbezüglich geringere Zahlen zu erwarten. Außerdem sind neben der persönlichen Aufklärung Übergangsmodelle denkbar. So könnte die Ablehnung aufgrund kapillärer Hb-Werte seitens des BRK zunächst beibehalten und durch zusätzliche passive Maßnahmen für Spender mit hohen ZnPP-Werten ergänzt werden. Ebenfalls denkbar wäre eine Ablehnung der Spender mit auffälligen ZnPP-Werten erst dann, wenn wiederholt hohe ZnPP-Werte gemessen wurden. Sehr hohen Ablehnungszahlen durch die ZnPP-basierte Selektion könnte damit gegebenenfalls entgegengewirkt werden. Es bleibt zu prüfen, ob diese Maßnahmen oder schon die Ausgabe zusätzlicher Informationsbroschüren bei hohen ZnPP-Werten den Eisenhaushalt der Spender stabilisieren könnten. Das Informationsmaterial könnte beispielsweise Empfehlungen zur Anpassung des Spendeintervalls in Abhängigkeit vom gemessenen ZnPP-Wert, zur Diät bei Eisenmangel oder typischen Symptomen bei fortgeschrittenem Eisenmangel enthalten. Eine diesbezüglich durchgeführte prospektive Studie könnte die Auswirkungen einer Aufklärung der Blutspender untersuchen und gleichzeitig Informationen in einer durchschnittlichen Spenderpopulation sammeln. Damit könnten beispielsweise die wahren Ablehnungszahlen bei zusätzlicher ZnPP-Messung genauer eingegrenzt werden.

Unabhängig von kommenden Studien konnten die vorliegenden Daten bereits zeigen, dass alle faseroptischen Messungen den Schutz regelmäßiger Blutspender durch zuverlässige Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie optimieren könnten. Die erstmals untersuchte faseroptische Messung am Blutentnahmeschlauch hat sich im Rahmen der Analysen als valide erwiesen und zeigte eine mit der HPLC-Referenz vergleichbare diagnostische Güte.

4.5 Hb-Wert Follow-up (BRK POCT-Folgemesung, kapillär)

Im Follow-up der kapillären Hb-Werte (BRK POCT-Folgemesung, kapillär) wurden die Hb-Werte der Spender bei ihrer nächsten Spende nach Studienteilnahme analysiert. Es zeigte sich bei Betrachtung der Studienpopulation mit Folgewerten ein signifikanter Hb-Wert-Abfall mit einer Differenz von 0,9 g/dl. Dies passt zunächst zu der bereits

getroffenen Aussage, dass eine Blutspende die Eisenspeicher der Spender beansprucht. Allerdings lässt der Hb-Wert keinen sicheren Rückschluss auf den Eisenhaushalt zu, da ein Hb-Wert-Abfall weitere Ursachen haben kann. Diese sind beispielsweise ein Vitamin-B12-Mangel, akute Blutverluste oder Erkrankungen des blutbildenden Systems. Letztere sind im Rahmen der Blutspenden jedoch weniger wahrscheinlich, da von gesunden Probanden auszugehen ist. Ein derartiger Hb-Wert-Abfall in der Population, gerade bei Spendern, die an die regelmäßigen Blutentnahmen gewöhnt sind, scheint in jedem Fall zu drastisch. Bei der Ergebnisanalyse ist daher der Messmodalität besondere Beachtung zu schenken. Das Kapillarblut im Hb-Wert Follow-up wurde bei allen Studienteilnehmern mittels Punktion der Fingerbeere gewonnen. In der Messung während der Studiendurchführung erfolgten jedoch 90% der Messungen am Ohrläppchen. Bei bereits stattgefundenen Betrachtung der zentralen Tendenz dieser 90% in Gegenüberstellung zu den 10%, deren Hb-Messung am Kapillarblut der Fingerbeere erfolgte, ergaben sich niedrigere Werte bei der Messung an Kapillarblut der Fingerbeere. Der Abfall der Hb-Werte bei der Hb-Folgemessung kann damit als zusätzlicher Hinweis darauf gesehen werden, dass die Hb-Bestimmung an der Fingerbeere bei höherer Fallzahl signifikant niedrigere und damit der venösen Messung ähnlichere Werte hervorbringt.

Damit hätte die Änderung auf die Punktion der Fingerbeere beim BRK einen protektiven Effekt für die Blutspender. Diese Verbesserung der Hb-Wert-Bestimmung wurde bei der Einführung der neuen Messmethode vom BRK beabsichtigt. Zusätzlich zum obenstehenden Hinweis auf höhere Genauigkeit der Hb-Bestimmung bei Punktion der Fingerbeere, wurde die Unzulänglichkeit der Messungen bei Punktion des Ohrläppchens bereits mehrfach wissenschaftlich bestätigt [51-53]. Eine Reevaluation der Aussagen über die derzeitige Spenderselektion des BRK ist aufgrund der stattgefundenen Umstellung angezeigt.

Neben der aufgrund der Umstellung auf Punktion der Fingerbeere reduzierten Aktualität mancher Studienergebnisse, erschwert die veränderte Messmethodik die Ergebnisinterpretation bezüglich der Vorhersagekraft des ZnPP-Wertes. Durch eine Unterteilung der Studienteilnehmer in zwei Gruppen gelang dennoch eine interessante

Feststellung. Gegenüber den Spendern mit gesunkenen Hb-Werten im Follow-up zeigten diejenigen mit gestiegenen Hb-Werten signifikant höhere ZnPP-Werte. Zu erwarten war das genaue Gegenteil, da ein Hb-Wert-Abfall idealerweise mit zuvor hohen ZnPP-Werten einhergeht. Eine Verzerrung ist bei erhöhter Anzahl gesunkener Hb-Werte aufgrund der Hb-Bestimmung aus der Fingerbeere nicht auszuschließen. Jedoch kann auch eine Besonderheit in der Studiendurchführung die überraschenden Ergebnisse erklären. Während der Studie wurden Probanden mit deutlich erhöhten ZnPP-Werten auf einen eventuell bestehenden Eisenmangel hingewiesen und über eisenreiche Nahrungsmittel aufgeklärt. Es wurde deutlich gemacht, dass sich das Gerät in einer Testphase befindet und dass aufgrund des Ergebnisses lediglich eine Annahme über den Eisenstatus gemacht werden kann. Dennoch ist möglich, dass die Probanden ihre Ernährung infolge des Hinweises durch das Studienteam angepasst haben. Damit kann es zu einem Performancebias gekommen sein, das die unerwarteten Ergebnisse im Hb-Wert Follow-up erklären könnte.

4.6 Stärken und Schwächen der Studie

Im Rahmen der Analyse und Interpretation der vorliegenden Studiendaten ergab sich kein Hinweis auf grobe systematische Fehler, welche der Beantwortung der primären Fragestellungen hinderlich gewesen wären. Dennoch hätte die Beachtung oder Vermeidung nachfolgender Punkte zum Erhalt darüber hinaus gehender wertvoller Informationen oder höherer Präzision der gemachten Aussagen geführt.

Bis auf wenige personenbezogene Daten, wie Alter und Geschlecht wurden keine Informationen zum Gesundheitszustand der Probanden eingeholt. Diese Daten wurden durch das BRK im Rahmen des Arztgesprächs vor der Blutspende erhoben. Ein Zugriff war im Rahmen der Studie allerdings nicht vorgesehen. Bei Blutspendern ist von gesunden Probanden auszugehen. Dennoch hätten beispielsweise Informationen zur Spendehäufigkeit über das vergangene Jahr hinaus oder zu Gewicht und Körpergröße eine weiterführende Beurteilung der Blutwerte der Probanden erlaubt. So zum Beispiel, ob eine Adaptation der Erythropoese an jahrelanges, regelmäßiges Blutspenden bereits

erfolgt sein konnte oder ob ein erhöhter Ferritinwert womöglich auf eine dysmetabolische Hyperferritinämie [54] zurückgeführt werden kann.

Bei der Auswahl der regelmäßigen Spender wurde eine hohe Spendenfrequenz gewählt. Damit sollten zum einen Probanden mit Hochrisikoprofil erreicht werden, die künftig von einer innovativen Diagnostik profitieren könnten. Zum anderen sollte die Studienpopulation eine hohe Prävalenz für Eisenmangel auch im hohen Stadium III (Eisenmangelanämie) aufweisen. Dies war im Vergleich zur Normalbevölkerung der Fall. Dennoch gab es in der Studienpopulation entgegen der Erwartung nur sechs Probanden mit ZnPP-Werten von über 100 $\mu\text{mol/mol}$ Häm. Ein Selektionsbias ist in Bezug auf diese Beobachtung nicht auszuschließen. Da bei chronischem Blutverlust eine Adaptation der Erythropoese erfolgen kann [55], wäre eine weniger strikte Auswahl der Spender eventuell von Vorteil gewesen, um mehr Probanden zu erfassen, deren Eisenstoffwechsel akut von der Blutspende beeinträchtigt ist. So zum Beispiel Spender, die erst begonnen haben regelmäßig Blut zu spenden.

Bei der Durchführung der Studie ist ein Performancebias in Bezug auf die unerwarteten Ergebnisse im Hb Follow-up nicht auszuschließen. Probanden mit hohen ZnPP-Werten wurden über einen eventuell bestehenden Eisenmangel aufgeklärt. Es kann dadurch zur Anpassung der Ernährung oder einer Verschiebung der Folgespende gekommen sein. Auch wenn dies ethische Bedenken aufwirft, wäre es zur Beurteilbarkeit der prädiktiven Potenz der faseroptischen Messungen von Vorteil gewesen, die Patienten darum zu bitten, ihre gewöhnliche Diät fortzuführen und neben dem Hb auch ein ZnPP Follow-up durchzuführen. Zudem wurden die Daten aus der Folgespende unabhängig vom Zeitraum zwischen Erst- und Zweitspende interpretiert. Da ein kürzeres Spendenintervall die Eisenspeicher stärker beansprucht, wären weiterführende Informationen diesbezüglich von Interesse gewesen.

In der Diskussion wurde bereits erwähnt, dass eine Verunreinigung der Haut bei der transdermalen Messung womöglich zu verfälschten Ergebnissen führen kann. Eine standardisierte Reinigung der Lippen

hätte eventuelle Messfehler zum Beispiel durch Lippenstift ausschließen können.

Ein weiterer Störfaktor bei der transdermalen ZnPP-Bestimmung kann starker Raumlichteinfall während der Messung sein. Auch wenn darauf geachtet wurde, dass dies nicht der Fall war, muss die Veränderung der Lichtverhältnisse zwischen den Studienorten als variable Messbedingung genannt werden.

Wie bereits bei der Ergebnisanalyse thematisiert, haben sich unerwartet hohe Differenzen gegenüber der ersten HPLC-Messung (Volkman Labor-Messung) bei der HPLC-Wiederholungsmessung (Volkman Labor-Wiederholungsmessung) ergeben. Die HPLC-Messung wurde als Referenz gewählt und die Abweichungen davon als Gütekriterium für die faseroptischen Messungen herangezogen. Bei erneuter Durchführung der Untersuchungen mit der HPLC-Wiederholungsmessung als Referenz ist mit einem veränderten Outcome zu rechnen. Die festgestellte Varianz der Referenzmessungen reduziert dementsprechend die Reliabilität der Aussagen über die Güte der faseroptischen Messungen. An dieser Stelle ist jedoch zu erwähnen, dass die HPLC-Messung derzeit die Standardmethode für die Bestimmung von ZnPP aus Blutproben darstellt und daher keine alternative Referenzmethode hinzugezogen wurde. Alle Messungen wurden im MVZ Labor PD Dr. Volkman und Kollegen GbR durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein nach DIN EN ISO 15189:2014 akkreditiertes Labor, sodass eine hohe Qualität der Analysen für die Referenzmessungen gewährleistet war.

Ebenso wurde die Bedeutung der gemachten Aussagen dadurch reduziert, dass zum Ende der Studie ein Wechsel auf die kapilläre Hb-Bestimmung (BKR POCT-Messung, kapillär) durch Punktion der Fingerbeere erfolgte. Es kann angenommen werden, dass die Hb-Messung bei der Blutspende dadurch seit Umstellung auf die Messung an der Fingerbeere gegenüber der Messung am Ohrläppchen verlässlicher geworden ist [51-53] und die Differenzen zur faseroptischen Messung bezüglich der Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie weniger drastisch.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Gesamtpopulation regelmäßiger Blutspender ist bei relativ kleiner Probandenzahl eingeschränkt. Besonders bei Fragestellungen, die Untergruppen der Studienpopulation betrafen, stieß die Studie aufgrund zu geringer Fallzahlen an ihre Grenzen. Diese Detailinformationen waren jedoch nicht primärer Gegenstand der in erster Linie als Machbarkeitsstudie ausgelegten Untersuchung und somit entbehrlich für die Kernaussagen der vorliegenden Arbeit.

Bei zwar limitierter Populationsgröße, war jedoch die Zusammensetzung der Studienpopulation gut geeignet, um die zu untersuchende Risikogruppe zu repräsentieren.

Warum die vorliegende Studie außerdem eine hohe Aussagekraft hat und über die Anwendung der optischen Verfahren beim Blutspendedienst hinaus von Belang ist, wird im Folgenden zusammengefasst.

Die Prozentanteile der Spender an der Studienpopulation nach Geschlecht und Alter entsprachen den Prozentanteilen der Spender an der Spenderpopulation des BRK im Studienjahr in Bayern. Damit ist eine hohe externe Validität gewährleistet.

Auf dieser Basis und durch die Relevanz der Spendebereitschaft in der Gesellschaft ist eine hohe klinische Bedeutung der Studie gegeben. Bereits in der Einleitung wurde die Bedeutsamkeit der Blutprodukteverfügbarkeit dargestellt und erläutert, wie die Verbesserung der Erkennung von Eisenmangel unter regelmäßigen Spendern zum Erhalt der Spenderzahlen beitragen kann.

Die Daten für die Beantwortung der festgelegten Fragestellung wurden durch ein kleines Studienteam von nur fünf zur Messung berechtigten Personen erhoben. Vier der Untersucher waren maßgeblich an der Entwicklung der faseroptischen Messmethode beteiligt. Damit war eine exzellente Kenntnis der Messtechnik bei der Studiendurchführung verbunden. Die verschiedenen Methoden der faseroptischen Messung wurden vorab durch das Studienteam unter Laborbedingungen getestet und Fehlerquellen aufgedeckt. Damit konnten die verschiedenen

Messungen bereits im Voraus optimiert werden. So wurden zum Beispiel die Positionierung des Messapplikators auf der Unterlippe, die ideale Pipettierung bei der Küvetten-Messung, Unregelmäßigkeiten der Blutentnahmeschläuche verschiedener Hersteller sowie die Veränderung der Messergebnisse bei unterschiedlicher Blutflussrate im Blutentnahmeschlauch untersucht. Störfaktoren, die im Rahmen einer Studie nicht auszuschließen sind, wie Stöße gegen das Messgerät oder gegen die lichtleitende Faser bei der Messung wurden erzeugt, um Messfehler systematisch auszuschließen. Im Rahmen der Studie wurden die Messungen daher mit hoher Exaktheit durchgeführt, sodass Messungenauigkeiten aufgrund von fehlerhafter Bedienung des Gerätes unwahrscheinlich waren. Eventuell auftretende technische Fehler wären durch die hohe fachliche Kompetenz im Studienverlauf erkannt, dokumentiert und zeitnah behoben worden. Zudem konnte eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen erreicht werden, da bereits durch die vorab erfolgten Untersuchungen eine Lernkurve durchlaufen wurde und die Messungen somit während der Studie nicht mehr variiert werden mussten. Die hohe Präzision der Studiendurchführung war für die vorliegende Studie hilfreich, um Störfaktoren für die Beurteilung der neuartigen Messungen zu minimieren. In künftigen Studien ist die Prüfung des Performancebias durch weniger geschultes Personal für den klinischen Einsatz von Bedeutung.

Das Auftreten von systematischen Fehlern wurde nicht nur durch die sorgfältige Durchführung der Messungen, sondern auch durch die standardisierten Rahmenbedingungen des ambulanten Blutspendedienstes, die Verwendung derselben Materialien zur Probenentnahme und der Analytik der Proben an einem Laborstandort unterbunden. Der einzige Unterschied in der Behandlung von Probanden bestand in der bewussten Aufklärung derjenigen mit hohen ZnPP-Werten bei der faseroptischen Messung. Diese Abweichung wurde aus ethischen Gründen akzeptiert, führte jedoch möglicherweise zur oben genannten Verzerrung im Hb-Wert Follow-up.

Eine Veränderung der Studienergebnisse durch Detektionsbias konnte aufgrund der rein objektiven Daten ausgeschlossen werden. Die Messwerte waren von der zwischenmenschlichen Interaktion zwischen Untersucher und Proband unabhängig. Auch die Befangenheit eines

Teils des Studienteams durch Interesse an der Funktionstüchtigkeit der eigens entwickelten Messtechnik hatte damit keinen Einfluss auf die erhobenen Daten.

Ein weiterer Vorzug ergab sich durch die hohe Anzahl erhobener Laborparameter je Studienteilnehmer. Eine verlässliche Einteilung nach Eisenmangelstadien lag dadurch als Basis für die Analysen zur diagnostischen Güte der Messmethoden vor.

Zudem wurde durch die Wahl der erhobenen Parameter eine Grundlage für eine kritische Hinterfragung der Studienergebnisse geschaffen. So erfolgte eine Gegenüberstellung der kapillären (BRK POCT-Messung, kapillär) und der venösen (KUM Labor-Messung, venös) Hb-Wert-Bestimmung ebenso wie eine Auseinandersetzung mit der Referenzmessung für die faseroptischen Messmethoden in Form einer HPLC-Wiederholungsmessung (Volkman Labor-Wiederholungsmessung). Durch den Paralleltest der verschiedenen Methoden der faseroptischen ZnPP-Bestimmung konnten die einzelnen Ergebnisse zueinander in Relation gesetzt werden. Dies ermöglichte bei höherem Informationsgehalt eine genauere Interpretation der gewonnenen Daten. Insgesamt konnte so durch einen hohen Umfang wertvoller Daten ein umfassendes Bild der diagnostischen Möglichkeiten und des klinischen Nutzens der faseroptischen Messungen gezeichnet werden.

5 Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der Eisenmangelanämie als weltweit häufigste Anämieform [3] beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Erkennung dieser Krankheit und ihrer Vorstufen. Dem Molekül Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP) kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Im Rahmen der Bildung der Häm-Gruppe des Hämoglobins erfolgt bei ausreichend gefüllten Eisenspeichern eine Reaktion von Protoporphyrin IX mit zweiwertigem Eisen zu Häm. Ist nicht genügend Eisen vorhanden, reagiert Protoporphyrin IX zunehmend mit Zink-Ionen zu ZnPP. Das Verhältnis von ZnPP zu Häm steigt [26]. Bei Werten unter 40 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ ist ein Eisenmangel auszuschließen. Die Grenzen für einen bestehenden Eisenmangel mit eisendefizitärer Erythropoese (IDE) sowie für fortgeschrittenen Eisenmangel mit Eisenmangelanämie liegen bei 50 und 80 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$ [25, 27]. Die Besonderheit des ZnPP-Moleküls liegt in seiner Eigenfluoreszenz. So konnte am Laser-Forschungslabor der Ludwig-Maximilians-Universität München eine Messmethode entwickelt werden, welche den ZnPP-Wert nicht-invasiv zugänglich macht. Durch eine faseroptische Messtechnik kann ZnPP zur Fluoreszenz angeregt und mittels Spektralanalyse quantifiziert werden. Die Bestimmung erfolgt durch Aufsetzen eines Sensors auf das unverhornte Plattenepithel der Unterlippe. Durch Studien in der Gynäkologie ($n=56$) und Pädiatrie ($n=100$) konnten eine Sensitivität von 97% und 67% [29] sowie eine Spezifität von 90% und 97% [30] für das innovative Verfahren ermittelt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Studie untersucht die faseroptische Messtechnik an einer weiteren Studienpopulation. Es wurden dafür regelmäßige Blutspender gewählt, die einem hohen Risiko für Eisenmangel unterliegen [1, 2]. Um einen Schutz der Spender durch Vermeidung von Spenden bei bereits erschöpften Eisenspeichern zu gewährleisten, wäre eine Früherkennung von Eisenmangel unmittelbar am Ort der Blutspende sinnvoll. Die faseroptische Messung wurde daher an die Bestimmung von ZnPP durch den Blutentnahmeschlauch während der Blutspende angepasst und kam auf diese Weise erstmals zur Anwendung. Insgesamt wurden

100 regelmäßige Spender an 11 Standorten der mobilen Blutspende des Blutspendedienstes untersucht. Als regelmäßige Spender galten Männer, die in den vorangegangenen 12 Monaten mindestens vier Vollblutspenden geleistet hatten und Frauen mit mindestens drei Vollblutspenden im genannten Zeitraum.

Die Studienpopulation bestand nach vollständiger Rekrutierung aus 40% Frauen und 60% Männern mit einem Altersmittelwert von 46 Jahren bei weiblichen und 51 Jahren bei männlichen Teilnehmern. Mithilfe von Laborparametern aus venösem Vollblut wurden die Probanden entsprechend etablierter Eisenmangelstadien [24, 26, 37] eingeteilt. Stadium I entsprach erschöpften Eisenspeichern bei reduziertem Ferritinwert und normwertigem sTfR sowie ebenfalls normwertigem Hb. In Stadium II bestand eine IDE bei reduziertem Ferritin- und erhöhtem sTfR-Wert. Bei zusätzlich niedrigem Hb-Wert wurde eine Eisenmangelanämie diagnostiziert und die Probanden dementsprechend Stadium III zugeordnet. Es ergab sich für die Studienpopulation nach dieser Einteilung eine Eisenmangelprävalenz von 53%. 26% konnten Stadium I zugeordnet werden. Stadium II und III lag in 14% und 7% der Fälle vor. Zusätzlich zeigten 6% Eisenmangel, der sich der exakten Stadieneinteilung entzog. Die Gesamtprävalenz lag damit weit über der Periodenprävalenz für Eisenmangel für Personen im Alter von 45-64 Jahren in Deutschland. So geht der Schwerpunktbericht der Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2005 von einer Prävalenz von 21% für Frauen und 3,5% für Männer in dieser Altersgruppe aus [42].

Dass regelmäßige Blutspender eine Hochrisikogruppe für Eisenmangel darstellen [1, 2], konnte damit prinzipiell bestätigt werden. Umso wichtiger ist die adäquate Selektion vor der Blutspende. Eine verlässliche Feststellung von Eisenmangel mit exakter Stadieneinteilung wäre Voraussetzung für den Schutz der Spender. So könnten Spender ihrem Eisenhaushalt entsprechend abgelehnt oder beispielsweise über diätetische Maßnahmen bei erschöpften Eisenspeichern aufgeklärt werden.

Routinemäßig werden zur Spenders Selektion derzeit die kapillären Hb-Werte potentieller Spender beim Blutspendedienst ermittelt. Eine

Ablehnung erfolgt aufgrund von Hb-Werten unter 13,5 g/dl bei Männern und unter 12,5 g/dl bei Frauen. Zur Evaluation der kapillären Hb-Bestimmung diente eine Gegenüberstellung mit der venösen Referenzmessung. Es zeigte sich eine signifikante Wertepaar-Differenz von 0,8 (+/- 0,1) g/dl, wobei die kapillären Werte höher ausfielen. Eine Bland-Altman-Analyse ergab 95% LoA zwischen 1,6 und -3,2 g/dl. Für die Einteilung der Blutspender bedeutete dies eine fälschliche Zulassung von 57% der Probanden mit Anämie und 93% derjenigen mit IDE. Aufgrund der venösen Hb-Werte wäre kein potentieller Spender mit Eisenmangelanämie zugelassen worden, bei weiterhin hoher Zulassungsquote derjenigen mit IDE von 71%. Sensitivität und Spezifität für die Erkennung von Eisenmangelanämie lagen für die kapilläre Hb-Bestimmung bei 43% und 97%. IDE und Eisenmangelanämie konnten mit Werten von 19% und 97% nur ungenügend erkannt werden. Es konnte damit gezeigt werden, dass zum Studienzeitpunkt ein Defizit in der Spenderselektion und eine damit verbundene Belastung von Spendern mit bereits fortgeschrittenem Eisenmangel bestand.

Da ZnPP bereits bei Beeinträchtigung der Erythropoese durch Eisenmangel ohne Hb-Wert-Abfall auffällig wird, wäre eine Optimierung mithilfe der faseroptischen Messungen denkbar. Besonders die nicht-invasiven Messungen wären dabei für den Blutspendedienst bei Verfügbarkeit als POCT-Messung von Interesse.

Für die Analyse der nicht-invasiven Messtechnik wurde als Referenz die invasive faseroptische ZnPP-Bestimmung an venösem Blut in einer Küvette sowie die ZnPP-Bestimmung mittels HPLC gewählt. Die Gegenüberstellung ergab für alle faseroptischen Messungen keine signifikanten Wertepaar-Differenzen gegenüber der HPLC-Referenz. Die 95% LoA lagen für die Messung an der Küvette bei -24 bis 23 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$. Für die transdermale ZnPP-Bestimmung sowie die Messung am Blutentnahmeschlauch zeigten sich Grenzen von -29 bis 28 und -15 bis 14 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$. Bei einer ZnPP-Differenz zwischen den Eisenmangelstadien von 30 $\mu\text{mol/mol Häm}$ konnten damit alle Messungen eine Einteilung der Probanden mit einer Unsicherheit von maximal +/- einem Eisenmangelstadium ermöglichen. Bei 95% der Probanden

hätte damit eine sichere Feststellung von Stadium II oder III bei bestehender Eisenmangelanämie stattgefunden, sodass zum Schutz des Spenders eine Aufklärung oder Ablehnung hätte erfolgen können. Die innovative Messung am Blutentnahmeschlauch konnte darüber hinaus für über zwei Drittel auch die Erkennung derjenigen in Stadium II als mindestens grenzwertig eisendefizitär garantieren. Bei ZnPP-Bestimmung durch die übrigen faseroptischen Messungen war eine Fehleinschätzung als gesund bei vorliegender eisendefizitärer Erythropoese nicht auszuschließen.

Neben der Analyse nach Bland und Altman dienten Sensitivität und Spezifität der Beurteilung der diagnostischen Güte der faseroptischen Messmethoden. Alle Methoden zeigten eine höhere Sensitivität und Spezifität für die Erkennung von Eisenmangelanämie als für die Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie bei Verwendung der etablierten Cutoffs von 80 und 50 $\mu\text{mol/mol}$ Häm. Die Küvetten-Messung entsprach der HPLC-Messung bis auf Abweichungen von maximal 2%-Punkten. Sie zeigte eine Sensitivität und Spezifität von 86% und 94% für die Erkennung von Eisenmangelanämie sowie von 71% und 67% für die Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie (Stadium II und III). Durch die transdermale Messung ergaben sich Werte von 71% Sensitivität und 94% Spezifität für die Erkennung von Stadium III und 67% und 74% für die Spenderzuordnung zu Stadium II und III. Ausschließlich die Messung am Blutentnahmeschlauch zeigte eine nennenswerte Abweichung von der hohen diagnostischen Güte der faseroptischen Messungen im Bereich der Sensitivität für die Erkennung von Eisenmangelanämie. Hier zeigte sich eine Sensitivität von 50% bei 95% Spezifität gegenüber 67 und 71% für die Erkennung von Stadium II und III. Insgesamt belegen diese Werte eine angemessene bis gute diagnostische Güte der faseroptischen Messmethoden für die Erkennung der Stadien II und III bei den genannten Cutoffs. Besonders in Gegenüberstellung zur kapillären Hb-Bestimmung konnte somit der Mehrwert der faseroptischen Messungen sichtbar gemacht werden.

Durch Anwendung der nicht-invasiven faseroptischen Messungen wäre eine Anhebung der Sensitivität für die Erkennung von

Eisenmangelanämie um mindestens 7%-Punkte bis 28%-Punkte möglich. Für die Erkennung von IDE und Eisenmangelanämie ergab sich eine um 48%-Punkte verbesserte Zuordnung. Um diese Werte zu veranschaulichen, wurde anhand der Studienpopulation skizziert, wie sich die Durchführung der Messung am Blutentnahmeschlauch im Rahmen der Blutspende auf den Schutz der Spender ausgewirkt hätte. Durch ausschließliche Selektion mittels kapillärer Hb-Bestimmung wurden 57% der Probanden mit Eisenmangelanämie und 93% der Probanden mit IDE zur Spende zugelassen. Diese Zahlen hätten aufgrund der zusätzlichen faseroptischen Messung am Blutentnahmeschlauch auf 29% und 79% gesenkt werden können. Dies entspricht einer relativen Risikoreduktion für die irrtümliche Zulassung bei fortgeschrittenem Eisenmangel von 49% und 15%. Zusätzlich hätte eine Aufklärung bei allen zugelassenen Spendern mit Eisenmangelanämie sowie bei 55% der zugelassenen Spender mit eisendefizitärer Erythropoese erfolgen können. Durch Informationen zum Selbstmanagement bei Eisenmangel wäre daher bei vorausgesetzter Compliance von geringeren negativen Auswirkungen einer Blutspende bei erschöpften Eisenspeichern auszugehen.

Eine Unsicherheit der Studie lag in der mangelnden Verlässlichkeit der ZnPP-Bestimmung mittels HPLC. Zur kritischen Betrachtung dieser Referenzmessung wurde eine wiederholte HPLC-Messung an denselben Blutproben der Studienteilnehmer durchgeführt. Dabei ergab sich bei zu erwartender signifikanter Korrelation der beiden Messreihen eine signifikante Wertepaar Differenz von im Mittel $-6,4$ ($\pm 1,3$) $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$. Die 95% LoA lagen zwischen -31 und 18 $\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$. Damit war die HPLC-Wiederholungsmessung die einzige ZnPP-Messung, deren Übereinstimmungsgrenzen die Differenzen zwischen den Eisenmangelstadien überschritt. Die Abweichung zwischen HPLC-Messung und HPLC-Wiederholungsmessung war größer als zwischen den faseroptischen Messungen und der HPLC-Messung. Die Eignung der HPLC-Messung als Referenz kann auf dieser Grundlage in Frage gestellt werden und reduziert die Aussagekraft der vergleichenden Betrachtungen.

Eine unvorhergesehene Abweichung ergab sich im Studienverlauf beim Hb-Wert Follow-up. Um in Ergänzung zu den gemachten Aussagen auch die prädiktive Potenz der ZnPP-Messungen beurteilen zu können, wurden die kapillären Hb-Werte der Studienteilnehmer bei der Folgespende spätestens 6 Monate nach Studiendurchführung betrachtet. Dabei zeigte sich ein signifikanter Hb-Wert-Abfall bei einer Differenz von 0,9 (+/- 0,1) g/dl. Dies ist womöglich auf die Änderung der Hb-Messmethode durch das BRK zum Zeitpunkt der Folgespende zurückzuführen. In der vorliegenden Studie wurden 90% der Hb-Werte durch Punktion am Ohrläppchen ermittelt. Die beim Follow-up durchgeführte Hb-Wert-Bestimmung am Kapillarblut der Fingerbeere generiert niedrigere, der venösen Messung ähnlichere Werte [51]. Eine Aussage über den Vorhersagewert der ZnPP-Messung konnte durch diese Verzerrung nicht getroffen werden.

Es konnten jedoch keine groben systematischen Fehler detektiert werden, welche der Beantwortung der primären Fragestellungen hinderlich gewesen wären.

Die vorliegende Studie konnte den Mehrwert der faseroptischen Messungen beim Einsatz im Rahmen der Blutspende belegen. Es gelang eine Anpassung der innovativen faseroptischen Messmethode an die nicht-invasive Messung am Blutentnahmeschlauch, sodass auf Basis der Studienergebnisse eine reale Anwendung im Rahmen der Blutspende vorstellbar ist.

Mithilfe einer verbesserten Spenderselektion könnte fortgeschrittenem Eisenmangel unter Blutspendern so künftig vorgebeugt werden und eine verbesserte Gesunderhaltung regelmäßiger Blutspender erzielt werden. Eine Ablehnung von der Blutspende senkt die Wahrscheinlichkeit erneut zu spenden nachweislich [10]. Damit ginge der Nutzen einer Früherkennung von Eisenmangel sogar über den persönlichen gesundheitlichen Nutzen für die Blutspender hinaus. Eine Ablehnung von der Blutspende könnte durch sekundärpräventive Maßnahmen verhindert werden und die Wahrung der Spendebereitschaft in der Bevölkerung somit unterstützt werden.

Literaturverzeichnis

1. Cable RG, Glynn SA, Kiss JE, Mast AE, Steele WR, Murphy EL, et al. Iron deficiency in blood donors: the REDS-II Donor Iron Status Evaluation (RISE) study. *Transfusion*. 2012;52(4):702-11.
2. Baart AM, van Noord PA, Vergouwe Y, Moons KG, Swinkels DW, Wiegerinck ET, et al. High prevalence of subclinical iron deficiency in whole blood donors not deferred for low hemoglobin. *Transfusion*. 2013;53(8):1670-7.
3. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf SK, Johns N, Lozano R, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood*. 2014;123(5):615-24.
4. Statistisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000. URL: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboo-wasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=3&p_aid=83526092&nummer=550&p_sprache=D&p_indsp=99999999&p_aid=48720885. [Stand: 02.03.2019]
5. World Health Organization. Department of Nutrition for Health and Development. The global prevalence of anaemia in 2011. Geneva, 2015. ISBN: 978 92 4 156496 0.
6. World Health Organization. Department of Nutrition for Health and Development. Global Nutrition Targets 2025: Anaemia policy brief. Geneva, 2014. WHO reference number: WHO/NMH/NHD/14.4.
7. Rembold CM. Number needed to screen: development of a statistic for disease screening. *BMJ* (Clinical research ed). 1998;317(7154):307-12.
8. Mozaheb Z, Khayami M, Sayadpoor D. Iron Balance in Regular Blood Donors. *Transfusion medicine and hemotherapy* : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie. 2011;38(3):190-4.

9. Statistisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Gesundheitsversorgung: Blutspende, Bluttransfusion. URL: http://www.gbe-bund.de/gbe10/trecherche.prc_them_rech?tk=14501&tk2=18906&p_uid=gast&p_aid=64177948&p_sprache=D&cnt_ut=1&ut=18906. [Stand: 02.03.2019]
10. Hillgrove T, Moore V, Doherty K, Ryan P. The impact of temporary deferral due to low hemoglobin: future return, time to return, and frequency of subsequent donation. *Transfusion*. 2011;51(3):539-47.
11. Alkhalid Y, Lagman C, Sheppard JP, Nguyen T, Prashant GN, Ziman AF, et al. Restrictive transfusion threshold is safe in high-risk patients undergoing brain tumor surgery. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2017;163:103-7.
12. Munoz M, Leal-Noval SR. Restrictive transfusion triggers in major orthopaedic surgery: effective and safe? *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2013;11(2):169-71.
13. Spahn DR, Spahn GH, Stein P. Evidence base for restrictive transfusion triggers in high-risk patients. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*. 2015;42(2):110-4.
14. Ngwenya LB, Suen CG, Tarapore PE, Manley GT, Huang MC. Safety and cost efficiency of a restrictive transfusion protocol in patients with traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery*. 2018;128(5):1530-7.
15. Carson JL, Carless PA, Hebert PC. Transfusion thresholds and other strategies for guiding allogeneic red blood cell transfusion. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012(4):Cd002042.
16. Adams RC, Lundy JS. Anesthesia in Cases of Poor Surgical Risk: Some Suggestions for Decreasing the Risk. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 1942;3(5):603-7.

17. Vorstand und Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, Leitlinie zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln, 3. Auflage, 2003.
18. Vorstand der Bundesärztekammer auf Empfehlung des Wissenschaftlichen Beirats, Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln, 4. Auflage, 2014.
19. Bundesärztekammer auf Empfehlung ihres Wissenschaftlichen Beirats, Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten, Gesamtnovelle 2020. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln, 5. Auflage, 2021. ISBN 978-3-7691-3729-3.
20. Statistisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gesundheitsversorgung: Operationen und Prozeduren in Krankenhäusern. URL: http://www.gbe-bund.de/gbe10/trecherche.prc_them_rech?tk=14501&tk2=18502&p_uid=gast&p_aid=44908315&p_sprache=D&cnt_ut=11&ut=18651. [Stand: 02.03.2019]
21. Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes gemeinnützige GmbH, Abteilung Kommunikation und Marketing. Jahresbericht 2013. München, 2014.
22. Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes gemeinnützige GmbH, Abteilung Kommunikation und Marketing. Jahresbericht 2017. München, 2018.
23. Ferenz KB, Steinbicker AU. Artificial Oxygen Carriers-Past, Present, and Future-a Review of the Most Innovative and Clinically Relevant Concepts. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2019;369(2):300-10.
24. Hastka J, Heimpel H, Metzgeroth G. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. Eisenmangel und Eisenmangelanämie. 2011.

25. Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität München. Einsenderhandbuch Verfahrensliste. München, 9. Ausgabe, 2017.
26. Labbe RF, Vreman HJ, Stevenson DK. Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clinical chemistry*. 1999;45(12):2060-72.
27. Herklotz R, Huber A. Labordiagnose von Eisenstoffwechselstörungen [German] 2010.
28. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, Strauch M, Hehlmann R. Washing erythrocytes to remove interferents in measurements of zinc protoporphyrin by front-face hematofluorometry. *Clinical chemistry*. 1992;38(11):2184-9.
29. Hennig G, Homann C, Teksan I, Hasbargen U, Hasmuller S, Holdt LM, et al. Non-invasive detection of iron deficiency by fluorescence measurement of erythrocyte zinc protoporphyrin in the lip. *Nature communications*. 2016;7:10776.
30. Homann C, Hennig G, Maier F, Stepp H, Holdt LM, Vogeser M, et al. Non-invasive measurement of erythrocyte zinc protoporphyrin in children. *Pediatric research*. 2019;85(3):349-54.
31. Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut. Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie), Gesamtnovelle 2017. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln, 2017. ISBN 978-3-7691-3656-2.
32. Hennig G, Gruber C, Vogeser M, Stepp H, Dittmar S, Sroka R, et al. Dual-wavelength excitation for fluorescence-based quantification of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX in whole blood. *Journal of biophotonics*. 2014;7(7):514-24.
33. Heinisch O. Cochran, W. G.: *Sampling Techniques*, 2. Aufl. John Wiley and Sons, New York, London 1963. Preis s. *Biometrische Zeitschrift*. 1965;7(3):203-.
34. Israel, G.D. (1992) *Determining Sample Size*. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS, Florida.

35. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3(1):32-5.
36. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* (London, England). 1986;1(8476):307-10.
37. Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, Hehlmann R. Central role of zinc protoporphyrin in staging iron deficiency. *Clinical chemistry*. 1994;40(5):768-73.
38. Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM, Chumley C, Scott MG. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clinical chemistry*. 1998;44(1):45-51.
39. Tijić I, Vučić M, Golubović LM. The significance of soluble transferrin receptors in diagnosing iron deficiency anemia. 2015;23(3):275.
40. Shin DH, Kim HS, Park MJ, Suh IB, Shin KS. Utility of Access Soluble Transferrin Receptor (sTfR) and sTfR/log Ferritin Index in Diagnosing Iron Deficiency Anemia. *Annals of clinical and laboratory science*. 2015;45(4):396-402.
41. Stauch T. Zink-Protoporphyrin. In: Gressner AM, Arndt T, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 1-2.
42. Lademann J, Kolip P. Robert-Koch-Institut. Schwerpunktbericht der Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Gesundheit von Frauen und Männern im mittleren Lebensalter. ISBN: 3-89606-160-7. 2005.
43. Whitehead RD, Jr., Mei Z, Mapango C, Jefferds MED. Methods and analyzers for hemoglobin measurement in clinical laboratories and field settings. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2019;1450(1):147-71.
44. Patel AJ, Wesley R, Leitman SF, Bryant BJ. Capillary versus venous haemoglobin determination in the assessment of healthy blood donors. *Vox sanguinis*. 2013;104(4):317-23.

45. Rudolf-Oliveira RC, Goncalves KT, Martignago ML, Mengatto V, Gaspar PC, Ferreira Jdos S, et al. Comparison between two portable hemoglobinometers and a reference method to verify the reliability of screening in blood donors. *Transfus Apher Sci.* 2013;49(3):578-82.
46. Ardin S, Stormer M, Radojska S, Oustianskaia L, Hahn M, Gathof BS. Comparison of three noninvasive methods for hemoglobin screening of blood donors. *Transfusion.* 2015;55(2):379-87.
47. Krleza JL, Dorotic A, Grzunov A, Maradin M. Capillary blood sampling: national recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochemia medica.* 2015;25(3):335-58.
48. Avoy DR, Canuel ML, Otton BM, Mileski EB. Hemoglobin screening in prospective blood donors: a comparison of methods. *Transfusion.* 1977;17(3):261-4.
49. Carter JV, Pan J, Rai SN, Galandiuk S. ROC-ing along: Evaluation and interpretation of receiver operating characteristic curves. *Surgery.* 2016;159(6):1638-45.
50. Nei T. Freezing injury to erythrocytes. I. Freezing patterns and post-thaw hemolysis. *Cryobiology.* 1976;13(3):278-86.
51. Coburn TJ, Miller WV, Parrill WD. Unacceptable variability of hemoglobin estimation on samples obtained from ear punctures. *Transfusion.* 1977;17(3):265-8.
52. Chambers LA, McGuff JM. Evaluation of methods and protocols for hemoglobin screening of prospective whole blood donors. *American journal of clinical pathology.* 1989;91(3):309-12.
53. Radtke H, Polat G, Kalus U, Salama A, Kiesewetter H. Hemoglobin screening in prospective blood donors: comparison of different blood samples and different quantitative methods. *Transfus Apher Sci.* 2005;33(1):31-5.
54. Deugnier Y, Bardou-Jacquet E, Laine F. Dysmetabolic iron overload syndrome. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine.* 2016;200(2):327-33.

55. Fliedner TM, Hoelzer D, Steinbach KH, editors. Physiologische und pathologische Regulation der Erythropoese. 84 Kongreß; 1978 1978//; Munich: J.F. Bergmann-Verlag.

Anhang 1: Tabellen und Abbildungen der statistischen Planung

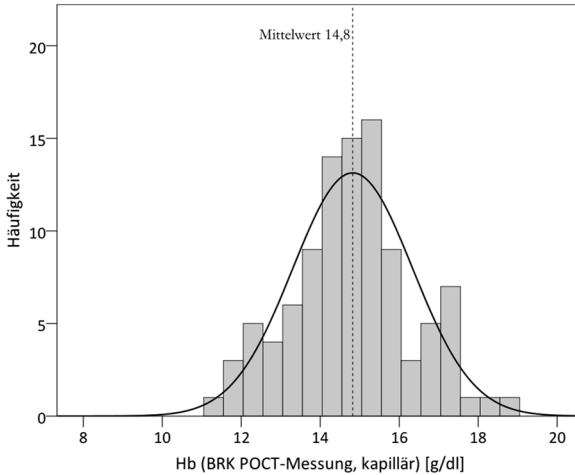


Abb. 33: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär), Verteilungsanalyse

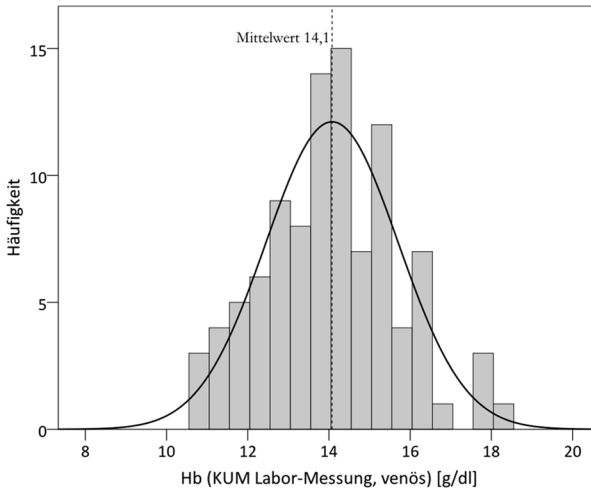


Abb. 34: Hb (KUM Labor-Messung, venös), Verteilungsanalyse

	Quotient Schiefe/ Standard- fehler	Quotient Kurtosis/ Standard- fehler	Abweichung von Normal-verteilung
Hb (KUM Labor- Messung, venös)	0,671 (0,163*/ 0,243*)	-0,200 (-0,096*/ 0,481*)	nicht signifikant [•]
Hb (BRK POCT- Messung, kapillär)	0,299 (0,072*/ 0,241*)	-0,326 (-0,156*/ 0,478*)	nicht signifikant [•]
[•]): auf dem 5%-Niveau bei einem Quotienten von <1,96 [*]): [g/dl]			

Tab. 26: Hb-Werte, Verteilungsanalyse

	Quotient Schiefe/ Standard- fehler	Quotient Kurtosis/ Standard- fehler	Abweichung von Normal-verteilung
Differenz: Hb (BRK POCT- Messung, kapillär) – Hb (KUM Labor- Messung, venös)	3,132 (0,761*/ 0,243*)	4,478 (2,154*/ 0,481*)	signifikant [•]
Differenz: Hb (BRK POCT- Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT- Folgemessung, kapillär)	1,356 (0,343*/ 0,253*)	0,728 (0,364*/ 0,500*)	nicht signifikant [•]
[•]): auf dem 5%-Niveau bei einem Quotienten von >1,96 [*]): [g/dl]			

Tab. 27: Hb-Differenzen, Verteilungsanalyse

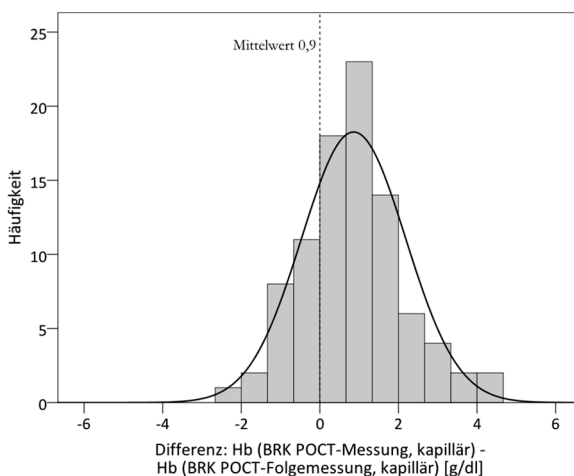


Abb. 35: Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT-Folgemessung, kapillär), Verteilungsanalyse

	Quotient Schiefe/ Standard- fehler	Quotient Kurtosis/ Standard- fehler	Abweichung von Normal- verteilung
ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor)	9,683 (2,353*/ 0,243*)	15,601 (7,504*/ 0,481*)	signifikant [•]
ZnPP (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL)	6,856 (1,714*/ 0,250*)	7,183 (3,556*/ 0,495*)	signifikant [•]
ZnPP (faseroptische Lippen-Messung, LMU-LFL)	9,440 (2,360*/ 0,250*)	15,591 (7,718*/ 0,495*)	signifikant [•]
ZnPP (faseroptisch Schlauch-Messung, LMU-LFL)	6,628 (1,657*/ 0,250*)	6,725 (3,329*/ 0,495*)	signifikant [•]
^(•) : auf dem 5%-Niveau bei einem Quotienten von >1,96 ^(*) : [$\mu\text{mol/mol Häm}$]			

Tab. 28: ZnPP-Werte, Verteilungsanalyse

	Quotient Schiefe/ Standard- fehler	Quotient Kurtosis/ Standard- fehler	Abweichung von Normal- verteilung
Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) – ZnPP (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL)	-3,788 (-0,947*/ 0,250*)	6,719 (3,326*/ 0,495*)	signifikant [•]
Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) – ZnPP (faseroptische Lippen-Messung, LMU-LFL)	-6,777 (-1,647* / 0,243*)	29,116 (14,005*/ 0,481*)	signifikant [•]
Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) – ZnPP (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL)	-13,461 (-3,271*/ 0,243*)	47,326 (22,764*/ 0,481*)	signifikant [•]
Differenz: ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) – ZnPP (HPLC- Wiederholungs-messung, Volkman Labor)	3,584 (0,871*/ 0,243*)	10,669 (5,132*/ 0,481*)	signifikant [•]
<p>([•]): auf dem 5%-Niveau bei einem Quotienten von >1,96 ([*]): [µmol/mol Häm]</p>			

Tab. 29: ZnPP-Differenzen, Verteilungsanalyse

	Quotient Schiefe/ Standard- fehler	Quotient Kurtosis/ Standard- fehler	Abweichung von Normal- verteilung
ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) aller Studienteilnehmern, deren Hb-Werte (BRK POCT- Folgemessung, kapillär) im Follow-up gesunken waren (Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT- Folgemessung) > 0)	8,163 (2,408*/ 0,295*)	12,412 (7,224*/ 0,582*)	signifikant [●]
ZnPP (HPLC-Messung, Volkman Labor) aller Studienteilnehmer, deren Hb-Werte (BRK POCT- Folgemessung, kapillär) im Follow-up gestiegen waren (Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT- Folgemessung) ≤ 0)	4,286 (2,023*/ 0,472*)	4,944 (4,539*/ 0,918*)	signifikant [●]
[●]): auf dem 5%-Niveau bei einem Quotienten von >1,96 [*]): [µmol/mol Häm]			

Tab. 30: ZnPP (HPLC-Messung, Labor Volkman) gruppiert nach gesunkenen/gestiegenen Hb-Werten im Follow-up (BRK POCT-Folgemessung, kapillär), Verteilungsanalyse

	Quotient Schiefe/ Standard- fehler	Quotient Kurtosis/ Standard- fehler	Abweichung von Normal- verteilung
Differenz: Hb (BRK POCT, kapillär) – Hb (KUM Labor-Messung, venös) (4 Ausreißer [▲])	0,206 (0,051*/ 0,247*)	0,543 (0,266*/ 0,490*)	Nicht signifikant [●]
Differenz: ZnPP (HPLC-Messung [◆]) – ZnPP (faseroptische Küvetten-Messung, LMU- LFL) (8 Ausreißer [▲])	0,957 (0,242 [■] / 0,253 [■])	0,190 (0,095 [■] / 0,500 [■])	Nicht signifikant [●]
Differenz: ZnPP (HPLC-Messung [◆]) – ZnPP (faseroptische Lippen- Messung, LMU-LFL) (3 Ausreißer [▲])	0,638 (0,157 [■] / 0,246 [■])	-1,117 (-0,545 [■] / 0,488 [■])	Nicht signifikant [●]
Differenz: ZnPP (HPLC-Messung [◆]) – ZnPP (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL) (5 Ausreißer [▲])	-0,518 (-0,113 [■] / 0,257 [■])	-0,419 (-0,213 [■] / 0,508 [■])	Nicht signifikant [●]
Differenz: ZnPP (HPLC-Messung [◆]) – ZnPP (HPLC-Wiederholungs- messung, Volkmann Labor) (6 Ausreißer [▲])	-0,032 (-0,008 [■] / 0,250 [■])	0,184 (0,091 [■] / 0,495 [■])	Nicht signifikant [●]
(*): [g/dl] (■): [µmol/mol Häm] (◆): HPLC-Messung Volkmann Labor (●): auf dem 5%-Niveau bei einem Quotienten von <1,96/>-1,96 (▲): Werte außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstandes			

Tab. 31: Übersicht der Wertepaar differenzen unter Ausschluss der Ausreißer, Verteilungsanalyse

Anhang 2: Tabellen der deskriptiven Statistik

Differenz: Hb (KUM Labor- Messung, venös) – Hb (BRK POCT- Messung, kapillär)	Mittelwert	-0,8 (SD: 0,1)
	95%-Konfidenzintervall	Untergrenze -1,0 Obergrenze -0,5
	5% getrimmtes Mittel	-0,8
	Median	-0,9
	Varianz	1,5
	Minimum/Maximum	-3,7/4,1
	Interquartilbereich	1,5
Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär) – Hb (BRK POCT- Folgemessung, kapillär)	Mittelwert	0,9 (SD: 0,1)
	95%-Konfidenzintervall	Untergrenze 0,6 Obergrenze 1,1
	5% getrimmtes Mittel	0,8
	Median	0,9
	Varianz	1,8
	Minimum/Maximum	-2,4/4,6
Differenz: Hb (KUM Labor-Messung, venös) – Hb (BRK POCT- Messung, kapillär aus Fingerbeere)	Mittelwert	-0,7 (SD: 0,4)
	95%-Konfidenzintervall	Untergrenze -1,5 Obergrenze 0,1
	5% getrimmtes Mittel	-0,7
	Median	-0,6
	Varianz	1,2
	Minimum/Maximum	-2,2/0,9
•	Interquartilbereich	2,4
	Mittelwert	-0,7
Einheit für alle Zahlenwerte dieser Tabelle: [g/dl] (•): Differenz: Hb (BRK POCT-Messung, kapillär aus Fingerbeere) – Hb (BRK POCT-Messung, kapillär aus Ohr läppchen)		

Tab. 32: Hb-Differenzen, Deskriptive Statistik

Differenz: ZnPP (HPLC- Messung, Volkmann Labor) – ZnPP (faseroptische Küvetten-Messung, LMU-LFL)	Mittelwert/Median	-0,8 (SD: 1,2)/-0,3
	95%-Konfidenzintervall	Untergrenze -3,2 Obergrenze 1,6
	5% getrimmtes Mittel	-0,0
	Varianz	142,0
	Minimum/Maximum	-81,6/36,2
	Interquartilbereich	7,8
Differenz: ZnPP (HPLC- Messung, Volkmann Labor) – ZnPP (faseroptische Lippen-Messung, LMU-LFL)	Mittelwert/Median	-0,5 (SD: 1,5)/-1,3
	95%-Konfidenzintervall	Untergrenze -3,4 Obergrenze 2,4
	5% getrimmtes Mittel	-0,3
	Varianz	214,8
	Minimum/Maximum	-89,2/50,3
	Interquartilbereich	14,3
Differenz: ZnPP (HPLC- Messung, Volkmann Labor) – ZnPP (faseroptische Schlauch-Messung, LMU-LFL)	Mittelwert/Median	-0,5 (SD: 0,8)/-0,1
	95%-Konfidenzintervall	Untergrenze -2,0 Obergrenze 1,1
	5% getrimmtes Mittel	-0,2
	Varianz	57,3
	Minimum/Maximum	-31,6/18,6
	Interquartilbereich	7,4
Differenz: ZnPP (HPLC- Messung, Volkmann Labor) – ZnPP (HPLC- Wiederholungs- messung, Volkmann Labor)	Mittelwert/Median	-6,4 (SD: 1,3)/-5,5
	95%-Konfidenzintervall	Untergrenze -8,9 Obergrenze -3,9
	5% getrimmtes Mittel	-6,2
	Varianz	157,7
	Minimum/Maximum	-67,5/23,6
	Interquartilbereich	12,3
Einheit für alle Zahlenwerte dieser Tabelle: [$\mu\text{mol ZnPP/mol Häm}$]		

Tab. 33: ZnPP-Differenzen, Deskriptive Statistik

Anhang 3: Tabellen der Bland-Altman-Analyse

Übereinstimmung zwischen Hb (KUM Labor-Messung, venös) und Hb (BRK POCT-Messung, kapillär)	t-Test	Mittlere Differenz	-0,775 [•]
		Standardabweichung	1,228 [•]
		t	-6,275 Signifikanz<0,001
	95% LoA	Obergrenze	1,632 [•]
		Untergrenze	-3,182 [•]
	Regression	Beta	0,118 Signifikanz=0,246

([•]): [g/dl]

Tab. 34: Übereinstimmung Hb-Werte, Bland-Altman-Analyse

Übereinstimmung zwischen ZnPP (HPLC-Messung♦) und ZnPP (faseroptische Küvetten-Messung*)	t-Test	Mittlere Differenz/SD	-0,808 [•] /11,918 [•]
		t	-0,675 Signifikanz=0,502
	95% LoA	Obergrenze	22,551 [•]
		Untergrenze	-24,167 [•]
Regression	Beta	-0,040 Signifikanz=0,694	
Übereinstimmung zwischen ZnPP (HPLC-Messung♦) und ZnPP (faseroptische Lippen-Messung*)	t-Test	Mittlere Differenz/SD	-0,475 [•] / 14,657 [•]
		t	-0,322 Signifikanz=0,748
	95% LoA	Obergrenze	28,257 [•]
		Untergrenze	-29,203 [•]
Regression	Beta	0,219 Signifikanz=0,029	
Übereinstimmung zwischen ZnPP (HPLC-Messung♦) und ZnPP (faseroptische Schlauch-Messung*)	t-Test	Mittlere Differenz/SD	-0,488 [•] / 7,572 [•]
		t	-0,622 Signifikanz=0,536
	95% LoA	Obergrenze	14,353 [•]
		Untergrenze	-15,329 [•]
Regression	Beta	0,040 Signifikanz=0,703	
Übereinstimmung zwischen ZnPP (HPLC-Messung♦) und ZnPP (HPLC-Wiederholungsmessung, Volkmann Labor)	t-Test	Mittlere Differenz/SD	-6,382 [•] / 12,558 [•]
		t	-5,056 Signifikanz<0,001
	95% LoA	Obergrenze	18,232 [•]
		Untergrenze	-30,996 [•]
Regression	Beta	-0,221 Signifikanz=0,028	
<p>(•): [g/dl] (♦): HPLC-Messung Volkmann Labor (*): LMU-LFL</p>			

Tab. 35: Übereinstimmung ZnPP-Werte, Bland-Altman-Analyse

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

**BESTIMMUNG VON ZINK-PROTOPORPHYRIN IX
MITTELS FASEROPTISCHER MESSTECHNIK
Nicht-invasive Eisenmangeldiagnostik
und ihre Bedeutung für regelmäßige Blutspender**

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Ort, Datum: München, 23.03.2022

Unterschrift: Anne Schliemann

Danksagung

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mit vielen motivierenden Kollegen zusammengearbeitet, die mir näher gebracht haben, was wissenschaftliche Forschung bedeutet. Die unmittelbare Chance, aus Überlegungen Experimente entstehen zu lassen und Problemen damit auf komplexen Wegen Lösungen gegenüberzustellen, hat mich beeindruckt. Ich bin sehr froh über die Eindrücke, die ich gewonnen habe und danke denjenigen, die maßgeblich an dieser Erfahrung beteiligt waren.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Ronald Sroka für die kollegiale Aufnahme am LIFE-Zentrum. Die Zusammenarbeit im Team des Laser-Forschungslabors und der wissenschaftliche Austausch mit Tiefgang und Bergluft waren eine echte Bereicherung für mich.

Herrn Prof. Dr. Michael Vogeser danke ich vielmals für die Bejahung der Analytik am Institut für Laboratoriumsmedizin des KUM, für interessante Einblicke in die Qualitätssicherung und wertvolle universitäre Kontakte über den Kontinent hinaus.

An Herrn Dr. Christian Homann einen besonderen Dank für die sagenhafte Mitbetreuung dieses Projekts. Die vielfältigen hilfreichen Impulse und kritischen Betrachtungen, die konstante unterstützende Präsenz und Rücksicht auf wiederkehrende Prüfungsphasen weiß ich sehr zu schätzen. Dass ich für diese spannende Etappe zur Arbeitsgruppe Eisenmangeldiagnostik stoßen durfte, war für mich ein wahrer Glücksfall.

Neben Herrn Dr. Christian Homann ebenfalls für die Entwicklung der faseroptischen Messtechnik und für meine Freude an dieser Arbeit verantwortlich waren Dr. Herbert Stepp, Dr. Georg Hennig und Dr. Alexander Lang. Danke für den Enthusiasmus im Team, den fachlichen Support und die tatkräftige Assistenz bei der Datenerhebung bis in die Nächte hinein.

Für die anschließende reibungslose Organisation der Analytik bedanke ich mich freundlich bei Frau Prof. Dr. Dr. Lesca Holdt, Frau Angela Winter und den medizinisch-technischen Assistenten am Institut für Laboratoriumsmedizin des KUM.

Aufrichtiger Dank weiterhin an Herrn Dr. Franz Weinauer für die Befürwortung unserer Zusammenarbeit mit dem Blutspendedienst des BRK. Ebenso allen Beteiligten, die eine Durchführung der Studie bei der mobilen Blutspende ermöglicht haben. Herr Dr. Ernst-Markus Quenzel, Herr Marko Hammer, das Ärzteteam sowie die medizinischen Fachkräfte vor Ort haben mir in jeder Phase der Studie viel Interesse, Offenheit und Flexibilität entgegengebracht.

Ohne unsere begeisterungsfähigen Probanden wäre diese Arbeit trotz aller Bemühungen der genannten Personen unmöglich gewesen. Danke daher an alle Studienteilnehmer für die Bereitschaft zur Beteiligung an unserem Projekt und die allseits aufgeschlossene und heitere Mitwirkung.

Gewidmet ist diese Dissertation meiner Familie.

Ich danke euch von Herzen für die stetige liebevolle Unterstützung.