

# Herstellung eines Referenzpräparates zur quantitativen Bestimmung von menschlichem IgG, IgA, IgM und Komplementfaktor C3

S. Giess, P. Kaiser

Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, Frankfurt

## Zusammenfassung:

Für Zulassungs- und Chargenprüfungen von Testsera und Testantigenen wurde aus einem Pool menschlicher Seren ein Referenzpräparat für die Bestimmung von IgG, IgA, IgM und Komplementfaktor C3 hergestellt.

Der Gehalt wurde mittels Radialer Immundiffusion (RID) gegen zwei WHO-Standards bestimmt und in Internationalen Einheiten (IU) angegeben. Das Präparat wurde in verschiedenen kommerziellen Systemen als Probe zur Bestimmung von IgG, IgA, IgM und C3 eingesetzt.

Die Meßmethoden umfaßten RID, Turbidimetrie, Nephelometrie, kinetische Nephelometrie und Fluoreszenzmessung. Die Ergebnisse zeigten, daß bei den verschiedenen Methoden mit unterschiedlichen Sollwerten für das Referenzpräparat gearbeitet werden muß.

## Schlüsselwörter:

Immunglobuline - Komplementfaktor C3 - Referenzpräparat - Standardisierung

## Summary:

For the purposes of admission and batch control of testsera and testantigens a pool of human sera was used to prepare a reference preparation for the determination of IgG, IgA, IgM and complement factor C3.

The content was calibrated by radial immunodiffusion (RID) against two WHO-Standards and declared in International Units (IU).

This preparation was used as a probe in different commercial systems for the determination of IgG, IgA, IgM and C3. The methods of measurement included RID, turbidimetry, nephelometry, kinetic nephelometry and fluorescence. The results showed that for different methods one has to work with different nominal values for the reference preparation.

## Keywords:

Immunoglobulins - complement factor C3 - reference-preparation - standardisation

## Einleitung

Die quantitative Bestimmung von IgG, IgA, IgM und Komplementfaktor C3 in menschlichem Serum gehört mittlerweile in der Diagnostik und klinischen Forschung zu den Standardmethoden, die es ermöglichen, Aussagen über den Immunstatus von Patienten zu machen. Während früher dafür nur die Radiale Immundiffusion (RID) zur Verfügung stand, bieten sich dem Anwender heute eine Anzahl weiterer Methoden an: Nephelometrie, Turbidimetrie und Fluoreszenzmessung. Immunologische Grundlage dieser Verfahren ist die spezifische Reaktion eines tierischen Antiserums mit den entsprechenden menschlichen Immunglobulinen und C3.

Im Gegensatz zu anderen Verfahren in der klinischen Chemie laufen Antigen-Antikörper-Reaktionen nicht stöchiometrisch ab.

Quantitatives Arbeiten ist unter diesen Voraussetzungen nur möglich, wenn die in einem menschlichen Serum gemessenen Wirkungen mit den Wirkungen eines Referenzpräparates verglichen werden, von dem vorausgesetzt wird, daß es in seinem Verhalten der zu untersuchenden Probe gleicht und daß sein Immunglobulingehalt bekannt ist. Der Versuch, bei Immunglobulin-Referenzpräparaten den Gehalt in Gewichtseinheiten über gereinigte Immunglobulin-Präparationen zu bestimmen, führte in früheren Jahren zu Schwierigkeiten. Die Ergebnisse verschiedener Hersteller waren untereinander nicht vergleichbar (1).

Dazu muß man sich vergegenwärtigen, daß es sich bei den Immunglobulinen um empfindliche Makromoleküle handelt, die zudem durch eine genetisch bedingte molekulare Heterogenität ausgezeichnet sind. Präparative Manipulationen, die zu einer Entfernung der Immunglobuline aus ihrem natürlichen Milieu führen, können mit dem Verlust eines Teils der Immunglobuline oder mit einer Veränderung der antigenen Eigenschaften der isolierten Moleküle verbunden sein. Die Folge ist, daß solche Präparate bei der Reaktion mit den homologen Antiseren ein anderes Verhalten zeigen als normale Serumproben. Um diesen Schwierigkeiten aus dem Weg zu gehen, wurden von

der WHO Immunglobulin-Standards entwickelt, die als lyophilisierte Serumpools zur Verfügung stehen. In diesen Standards wurde der Gehalt an Immunglobulinen in Internationalen Einheiten (IU) deklariert (2, 3). Ein weiterer WHO-Standard besitzt einen in Internationalen Einheiten deklarierten Gehalt an Komplementfaktor C3 (4). Diese Präparationen sind, da sie nur in begrenzter Stückzahl zur Verfügung stehen, als Primärstandards gedacht, an denen die Anwender ihre eigenen Referenzpräparate einstellen sollen.

Für die Zulassungs- und Chargenprüfungen von Testsera und Testantigenen zur quantitativen Bestimmung von IgG, IgA, IgM und Komplementfaktor C3 wurde vom Paul-Ehrlich-Institut ein Referenzpräparat hergestellt und mit den entsprechenden WHO-Standards kalibriert.

## Material und Methoden

### Herstellung des Referenzpräparates (PEI-Ref.2)

Das für die Herstellung notwendige Serumgemisch wurde vom Hessischen Blutspendedienst in Frankfurt aus Seren von 800 Spendern zusammengestellt. 1120 ml Mischserum wurden zur Entfernung von Lipiden auf 45°C erwärmt, mit 20 g/l Aerosil 380 (Degussa) versetzt, 4 Std. bei 45°C gerührt und anschließend 15 min bei 1700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde unter ständigem Rühren mit 1 g/l Natriumazid (Merck), 0,1 g/l Natriumtimmerfonat (Höchst), 80000 KIE/l Antagosan (Behring) als Proteinase-Inhibitor und 0,5 g/l EDTA (Merck) als Stabilisator versetzt. Nach der Membranfiltration (0,22 µm) wurde das Präparat in Portionen von 0,5 ml in Ampullen verfüllt und bei -70°C eingefroren.

Tab. 1

Meßprinzip	Antiseren	Meßgerät
Radiale Immundiffusion (RID)	EP combi RID (Immuno) NOR-Partigen (Behring) Quantiplate (Kallestad/Biotest)	Meßprojektor (Behring) Meßprojektor (Behring) Meßprojektor (Behring)
Turbidimetrie	aca Analytical Test Packs (Du Pont)	aca III (Du Pont)
Nephelometrie	Anti-Human-Serum (ATAB/AHS) LAS-R Antiseren (Hyland/Cooper) LN Antiseren (Behring)	Laser Nephelometer PDQ (Hyland) Laser Nephelometer PDQ (Hyland) Laser Nephelometer (Behring)
Kinetische Nephelometrie	Immunglobulin/Complement C3 Reagent (Beckman) Quantimetric 2 (Kallestad)	Immunochemistry Analyzer II (Beckman) Immunochemistry Analyzer II (Beckman)
Fluoreszenzmessung Festphase	FIAX Test Kits (IDT/Boehringer Ingelheim)	FIAX Fluorometer (IDT)

Tab. 2: Kalibrierung von PEI-Ref.2 an WHO-Standards

RID-Platten	Serumprotein	Gehalt (IU/ml)	Anzahl der Wiederholungsmessungen pro Verdünnungsstufe
NOR-Partigen	IgG	130,9	16
	IgA	134,8	16
	IgM	120,0	16
	C3c	76,2	24
Quantiplate	IgG	129,7	14
	IgA	128,4	12
	IgM	123,5	12
	C3	80,8	28

### Kalibrierung

Die Einstellung des PEI-Ref.2 an WHO-Standards erfolgte mittels RID auf Quantiplate Immundiffusionsplatten (Biotest/Kallestad) und NOR-Partigen Platten (Behring). Dazu wurde verwendet:

1. WHO international reference preparation of six human serum proteins mit einem Gehalt an C3 von 100 IU/ml,
2. Immunglobulin reference preparation 67/79 mit einem Gehalt von 96,2 IU/ml IgG, 95,3 IU/ml IgA und 96,2 IU/ml IgM.

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurden PEI-Ref.2 und die beiden Standards jeweils in drei verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt.

Messungen einzelner Verdünnungsstufen wurden, je nach Versuchsreihe, zwischen 12- und 18mal wiederholt (vgl. Tab.2). Auf den RID-Platten wurden Proben von 5 µl aufgetragen. Nach den von den Herstellern vorgeschriebenen Zeiten wurden die Durchmesser der Präzipitationsringe mit Hilfe eines Meßprojektors (Behring) ermittelt.

### Gehaltsbestimmung mit verschiedenen kommerziellen Systemen

Zur Bestimmung der Immunglobuline und des Komplementfaktors C3 in PEI-Ref.2 wurden die z.Z. wichtigsten Verfahren herangezogen (Tab.1). Antiseren, Referenzpräparate, Puffer und Geräte wurden nach den Hersteller-Vorschriften verwendet. PEI-Ref.2 wurde in den verschiedenen Systemen als Probe eingesetzt. Es wurden jeweils 100 Einzelbestimmungen in 10 unabhängigen Serien durchgeführt. Dabei wurden zwischen 5 und 10 verschiedene Antiserum-Chargen verwendet.

Für jede einzelne Serie wurden die Mittelwerte errechnet.

Aus den Mittelwerten der einzelnen Serien wurden die gewogenen Mittelwerte  $\bar{x}$  und die Standardabweichungen  $S$  bestimmt.

## Ergebnisse

Die Auswertung der bei der Kalibrierung von PEI-Ref. 2 an den beiden WHO-Standards erhaltenen Meßergebnisse erfolgte nach Empfehlungen der WHO über Dosis-Wirkungs-Kurven mit 6 Punkten. Dazu wurden die Meßwerte einer logarithmischen Transformation unterworfen. Die statistische Gültigkeit der Versuche wurde nach den im Europäischen Arzneibuch vorgeschlagenen Methoden überprüft (5).

Die Ergebnisse für PEI-Ref. 2 sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Gehaltsangaben für PEI-Ref. 2 erfolgten ausschließlich in Internationalen Einheiten (IU/ml), da die von der WHO vorgeschlagenen Faktoren für die Umrechnung in Gewichtseinheiten (mg/dl) mit Vorbehalt zu verwenden sind (6) und sich zum Teil von den Umrechnungsfaktoren der verschiedenen Antiserum-Hersteller unterscheiden.

Zur Absicherung der eigenen Meßwerte wurden einigen Herstellern Ampullen von PEI-Ref. 2 zur Gehaltsbestimmung überlassen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 3 zusammengefaßt. Bis auf einen Wert für IgM stimmen die

ermittelten Konzentrationen gut mit den von uns gefundenen Werten überein.

Die Gehaltsbestimmungen mit verschiedenen kommerziellen Systemen führten zu den in Tab. 4 zusammengefaßten Ergebnissen. Die aus den verschiedenen Serien errechneten gewogenen Mittelwerte wurden in mg/dl angegeben.

Aus den Mittelwerten der einzelnen Serien wurden die Standardabweichungen  $s$  errechnet und die Streuungsbereiche ( $\bar{x} \pm 2 S$ ) in Tab. 4 angegeben. Mit Hilfe der von den verschiedenen Herstellern verwendeten Umrechnungsfaktoren (vgl. Tab. 6) wurden die Ergebnisse von Tab. 4 in IU/ml umgerechnet und in Tab. 5 zusammengefaßt.

Antisera von Herstellern, die im Untersuchungszeitraum weniger als 5 Chargen zur Freigabe einreichten, wurden nicht berücksichtigt.

## Diskussion

Das Referenzpräparat PEI-Ref. 2 wurde im Paul-Ehrlich-Institut für die Zulassungs- und Chargenprüfungen von Testseren und Testantigenen zur quantitativen Bestimmung von menschlichem IgG, IgA, IgM und Komplementfaktor C3 hergestellt. Für die Kalibrierung mit den WHO-Standards wurde die Radiale Immundiffusion ausgewählt, da die „Immunglobulin reference preparation 67/97“ nach der Rekonstitution eine so hohe Eigentrübung aufweist, daß nephelometrische und turbidimetrische Techniken nicht eingesetzt werden können (7).

Tab. 3: Bestimmung des Immunglobulingehaltes von PEI-Ref. 2 durch verschiedene Hersteller

Methode		Anzahl der Messungen	IgG Konzentration			IgA Konzentration			IgM Konzentration		
			mg/dl	IU/ml	VK %	mg/dl	IU/ml	VK %	mg/dl	IU/ml	VK %
Beckman	kinetische Nephelometrie	2 x 20	1065	132	2,3	206	145	2,2	103	122	2,9
Behring	Lasernephelometrie	3 x 10	1203	138	4,0	244	145	4,6	117	135	6,1
Hyland	Lasernephelometrie	21	1044	135	11,8	204	136	10,5	84	102	10,6
Orion	Turbidimetrie	keine Angaben	1110	138	—	194	137	—	103	123	—

Tab. 4: Gehaltsbestimmung von PEI-Ref. 2 mit verschiedenen kommerziellen Systemen, Angaben in mg/dl. x Hersteller bietet keinen C3-Test an, + C3-Test konnte nicht berücksichtigt werden, da im Untersuchungszeitraum weniger als 5 Chargen eingereicht wurden, \* Ergebnisse für C3c-Fragment

Antiseren	IgG		IgA		IgM		C3 bzw. C3c	
	$\bar{x}$	$\bar{x} \pm 2S$	$\bar{x}$	$\bar{x} \pm 2S$	$\bar{x}$	$\bar{x} \pm 2S$	$\bar{x}$	$\bar{x} \pm 2S$
EP combi RID (Immuno)	1206	1056–1356	227	199–255	108	91,1–125	x	x
NOR Partigen (Behring)	1190	1051–1329	224	201–247	113	97,2–128	64,9*	55,5* – 74,3*
Quantiplate (Kallestad/Biotest)	1100	874–1326	219	182–256	99,9	83,4–116	94,9	77,8 – 112
aca Analytical Test Packs (Du Pont)	988	902–1074	201	174–228	93,0	68,2–118	x	x
Anti-Human-Seren (ATAB/AHS)	1095	863–1327	215	175–255	103	93,3–113	+	+
LAS-R Antiseren (Hyland/Looper)	1021	831–1211	214	167–261	101	90,9–111	98,8	84,2 – 113
LN Antiseren (Behring)	1185	986–1384	232	191–273	117	88,1–145	72,7*	53,7* – 91,7*
Immunglobulin/Complement C3								
Reagent (Beckman)	1082	994–1170	206	184–228	105	93,2–117	88,6	77,0 – 100
Quantimetric 2 (Kallestad)	1092	1018–1166	211	194–228	95,1	85,9–104	91,9	85,9 – 97,9
FIAX Test Kits (IDT/Boehringer Ingelheim)	1165	997–1333	223	176–270	120	95,0–144	91,3	77,2 – 105

Tab. 5: Gehaltsbestimmung von PEI-Ref. 2 mit verschiedenen kommerziellen Systemen, Angaben in IU/ml. ○ Faktor für die Umrechnung in IU nicht bekannt. × Hersteller bietet keinen C3-Test an. + C3-Test konnte nicht berücksichtigt werden, da im Untersuchungszeitraum weniger als 5 Chargen eingereicht wurden

Antiseren	IgG			IgA		IgM		C3	
	$\bar{x}$	$\bar{x} \pm 2S$		$\bar{x}$	$\bar{x} \pm 2S$	$\bar{x}$	$\bar{x} \pm 2S$	$\bar{x}$	$\bar{x} \pm 2S$
EP combi RID (Immuno)	139	121	-156	135	118-152	124	105-144	×	×
NOR Partigen (Behring)	137	121	-153	133	120-147	130	112-147	83,1	71,0-95,1
Quantiplate (Kallestad/Biotest)	127	101	-152	134	111-156	115	95,9-133	82,6	67,7-97,4
aca Analytical Test Packs (Du Pont)	114	104	-124	123	106-139	107	78,4-136	×	×
Anti-Human-Seren (ATAB/AHS)	126	99,3	-153	131	107-156	118	107-130	+	+
LAS-R Antiseren (Hyland/Cooper)	132	107	-156	143	111-174	122	110-134	○	○
LN Antiseren (Behring)	136	113	-159	138	114-162	135	101-167	93,1	68,7-117
Immunglobulin/Complement C3 Reagent (Beckman)	134	123	-145	145	129-161	124	110-138	○	○
Quantimetric 2 (Kallestad)	126	117	-134	129	118-139	109	98,8-120	80,0	74,7-85,2
FIAX Test Kits (IDT/Boehringer Ingelheim)	135	116	-155	136	107-165	138	109-166	79,8	67,5-91,8

Die Kalibrierung mit Hilfe von RID-Platten zweier Hersteller erbrachte eine gute Übereinstimmung der Konzentrationswerte, die durch die Messungen verschiedener Hersteller bestätigt wurde.

Da fast alle Hersteller für ihre Meßmethoden Faktoren zur Umrechnung in Internationalen Einheiten angeben (vgl. Tab. 6), kann man davon ausgehen, daß sie die von ihnen verwendeten Standards an den WHO-Standards oder entsprechenden Substandards kalibriert haben. Trotz dieser Tatsache zeigen die Ergebnisse von Tab. 5, daß die ermittelten Werte für PEI-Ref. 2 von Methode zu Methode mehr oder weniger von den Werten in Tab. 2 abweichen. Vermutlich sind hier neben den unterschiedlichen Meßprinzipien auch Unterschiede in der Avidität der verschiedenen Antiseren und Unterschiede in der Qualität der verschiedenen Firmen-Referenzpräparate von Bedeutung. Dies führt dazu, daß für die verschiedenen Methoden mit unterschiedlichen Sollwerten für PEI-Ref. 2 gearbeitet werden muß. Diese Befunde werden auch durch Untersuchungen anderer Autoren bestätigt (8).

Die Schwankungen der Meßergebnisse innerhalb einer Methode, die sich in den s-Werten widerspiegeln, sind sicher zum Teil auf Schwankungen in der Avidität der Antiseren von Charge zu Charge zurückzuführen, aber auch personenbezogene Faktoren bei der Testdurchführung dürften von Bedeutung sein.

In einem Zeitraum von mehreren Jahren, in denen PEI-Ref. 2 ständig bei Routineuntersuchungen eingesetzt wurde, konnten keine Veränderungen der Aktivität festgestellt werden. Wegen seiner geringen Eigentrübung war das Präparat auch bei nephelometrischen und turbidimetrischen Techniken einsetzbar.

Aufbauend auf den guten Erfahrungen mit PEI-Ref. 2 wurde in der Zwischenzeit eine weitere Charge PEI-Ref. 3 nach der gleichen Methode hergestellt. Sie wird ebenso bei Zulassungs- und Chargenprüfungen eingesetzt und hat mittlerweile die ältere Präparation abgelöst.

#### DANKSAGUNG

Wir danken dem Hessischen Blutspendedienst in Frankfurt für die Überlassung des benötigten Serumpools.

Wir danken den Firmen Beckman, Behring, Hyland und Orion für ihre Unterstützung bei den Gehaltsbestimmungen für PEI-Ref. 2.

Frau C. Schubert danken wir für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Messungen.

Tab. 6: Faktoren zur Umrechnung von Gewichtseinheiten (mg/dl) in Internationale Einheiten (IU/ml). \* Umrechnungsfaktor für C3c-Fragment

	IgG	IgA	IgM	C3 bzw. C3c
Beckman	0,124	0,704	1,18	
Boehringer Ingelheim	0,116	0,610	1,15	0,874
Behring	0,115	0,595	1,15	1,28*
Hyland	0,129	0,667	1,21	
ATAB	0,115	0,610	1,15	0,874
Kallestad	0,115	0,610	1,15	0,87
Immuno	0,115	0,595	1,15	
Du Pont	0,115	0,610	1,15	

#### Schrifttum:

1. HOSTY, T. A., HOLLENBECK, M., SHANE, J.: Intercomparison of results obtained with five commercial diffusion plates supplied for quantitation of immunoglobulins. Clin. Chem. 19, 524-526 (1973).
2. ROWE, D. S., ANDERSON, S. G., FAHEY, J. L.: Immunological reagents for quantitative reference purposes: a preparation of human serum immunoglobulins. Bull. Wld. Hlth. Org. 39, 992-993 (1968).
3. ROWE, D. S., ANDERSON, S. G., GRUB, B.: A research standard for human serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM. Bull. Wld. Hlth. Org. 42, 535-552 (1970).
4. REIMER, C. B., SMITH, S. J., HANNON, W. H., RITCHIE, R. F., VAN ES, L., BECKER, W., MARKOWITZ, H., GAULDIE, J., ANDERSON, S. G.: Progress towards international reference standards for human serum proteins. J. Biol. Stand. 6, 133-158 (1978).
5. Statistische Auswertung der Ergebnisse biologischer Wertmessungen und Reinheitsprüfungen. In: Deutsches Arzneibuch, 9. Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag/Govi-Verlag, Stuttgart/Frankfurt, S. 438-469 (1986).
6. ROWE, D. S., GRUB, B., ANDERSON, S. G.: An international reference preparation for human serum immunoglobulins G, A and M.: Content of immunoglobulins by weight. Bull. Wld. Hlth. Org. 46, 67-79 (1972).
7. WHICHER, R. J. T. et al.: Method-specific variations in the calibration of a new immunoglobulin standard suitable for use in nephelometric techniques. Clin. Chem. 24, 531-533 (1978).
8. SCHMOLKE, B., VORLAENDER, K. O.: Quantitative Plasmaprotein-Bestimmungen: Ergebnisse der Ringversuche 1984. Lab. med. 9, 74-77 (1985).

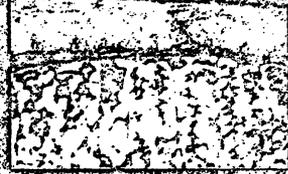
#### Anschrift der Verfasser:

Dr. Siegfried Giess  
Dr. Paul Kaiser  
Paul-Ehrlich-Institut  
Paul-Ehrlich-Straße 42-44  
6000 Frankfurt

HEP-2



Maus-Magen-Niere



O. Luciliae



# ENA

Nachweis von SM/RNP  
und SSA/SSB mittels Ouchterlony-  
Technik

## Kallestad DIAGNOSTIC

Deutschland:  
Habsburger Straße 4  
D-7800 Freiburg  
Telefon 49-(0)-761-51009-0

Schweiz:  
Zuchwilstrasse 41  
CH-4500 Solothurn  
Telefon 41-(0)-65-234151

Osterreich:  
Melissanweg 36  
A-4034 Linz  
Telefon (0732) 81431-12  
A-Wien  
Telefon (0222) 93 62 99

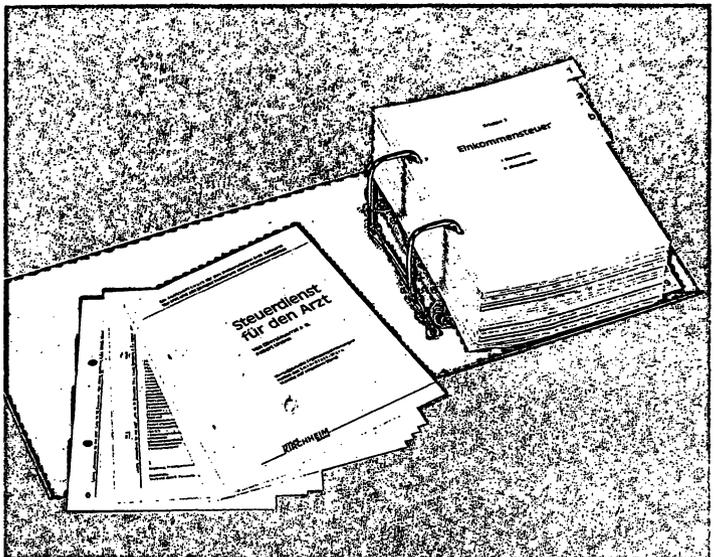
# Steuerdienst für den Arzt

Die für den Arzt einschlägigen Urteile finden Sie – nach Stichworten geordnet – in dem Loseblattwerk von Obersteuerrat Robert Linden.

Das Werk enthält u. a. die statistischen Kostensätze der Ärzte aller Fachrichtungen sowie Testbögen, die eine genaue Kostenanalyse der Praxis ermöglichen. Der Rationalisierung Ihrer Praxis dient das ausführliche „ABC der abzugsfähigen Ausgaben bei der Einkommensteuer“.

## Hand aufs Herz

- \* Verschenken Sie nicht auch Jahr für Jahr viel Geld an das Finanzamt?
- \* Nehmen Sie alle legalen Steuerminderungsmöglichkeiten in Anspruch?
- \* Stellen Sie rechtzeitig die notwendigen Anträge?
- \* Haben Sie Zeit und Gelegenheit, sich über Ihre berufsspezifischen Steuerfragen in den Steuerfachzeitschriften zu orientieren?
- \* Verlassen Sie sich ganz auf Ihren Berater?
- \* Haben Sie schon einmal einen Praxiskostentest gemacht?
- \* Wissen Sie, ob Sie mehr oder weniger als Ihre vergleichbaren Kollegen verdienen?



**VERLAG  
KIRCHHEIM  
MAINZ** Postfach 25 24, 6500 Mainz 1



Hiermit bestelle ich ein Grundwerk „**Steuerdienst für den Arzt**“ zum Preis von 79,80 DM und die künftig vierteljährlich erscheinenden Ergänzungslieferungen zum Seitenpreis von – ,37 DM.

Sie garantieren mir, daß ich diese Bestellung binnen einer Frist von einer Woche schriftlich widerrufen kann. Der Widerruf ist an den Verlag Kirchheim, Postfach 25 24, 6500 Mainz, zu richten. Zur Wahrung der Frist genügt die rechtzeitige Absendung des Widerrufs.

Anschrift:

Name: \_\_\_\_\_

Straße: \_\_\_\_\_

PLZ/Ort: \_\_\_\_\_

Datum/Unterschrift: \_\_\_\_\_

Datum \_\_\_\_\_

Unterschrift \_\_\_\_\_