



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**

Fakultät Life Sciences

Thema

**Die Ermittlung der Grenzen von Enzymimmunoassays im Drogenscreening  
anhand einer statistischen Datenanalyse**

Bachelorarbeit

im Studiengang

Medizintechnik

vorgelegt von

**Victoria Peter**

**Matrikelnummer: 1977326**

In Hamburg

Am 06.Dezember.2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schiemann (HAW Hamburg)
2. Gutachter: Dr. Siawusch Saadat (MAHSAN Diagnostika Vertriebsgesellschaft mbH)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Firma MAHSAN Diagnostika  
Vertriebsgesellschaft mbH

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung .....	1
2 Die historische Entwicklung von Enzymimmunoassays .....	6
3. Grundlagen.....	8
3.1 Funktionsprinzip .....	8
3.2 Testdurchführung laut Hersteller .....	10
4. Material und Methoden.....	13
4.1 Material.....	13
4.1.1 Substanzen und Pufferlösungen .....	13
4.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	15
4.2 Methoden .....	16
4.2.1 Störeffekte.....	16
4.2.2 Die Messung und Messwerte.....	17
4.2.3 Qualitätssicherung und Versuchsplan.....	18
4.2.4 statistische Datenanalyse .....	20
5 Ergebnisse .....	23
5.1 Amphetamine .....	23
5.1.3 Intra- und Interassay-Präzision .....	23
5.1.1 Differenzierbarkeit der Ergebnisse.....	25
5.1.2 Einfluss der Inkubationszeit, Temperatur und des Waschpuffers .....	26
5.1.4 Bewertung der statistischen Signifikanz.....	29
5.2 Benzodiazepine.....	32
5.2.1 Intra- und Interassay-Präzision .....	32
5.2.2 Differenzierbarkeit der Ergebnisse.....	35
5.2.3 Einfluss der Temperatur, Inkubationszeit und des Waschpuffers .....	36
5.2.4 Bewertung der statistischen Signifikanz.....	39
5.3 Buprenorphine.....	42
5.3.3 Intra- und Interassay-Präzision .....	42
5.3.1 Differenzierbarkeit der Ergebnisse.....	45
5.3.2 Einfluss der Inkubationszeit, Umgebungstemperatur und des Waschpuffers....	46

5.3.4	Bewertung der statistischen Signifikanz.....	50
5.4	Kokain .....	53
5.4.3	Beurteilung der Intra- und Interassay-Präzision.....	53
5.4.1	Differenzierbarkeit der Ergebnisse.....	55
5.4.4	Bewertung der statistischen Signifikanz.....	59
5.5	Methamphetamine.....	62
5.5.1	Intra- und Interassay-Präzision .....	62
5.5.2	Differenzierbarkeit der Ergebnisse.....	64
5.5.3	Der Einfluss von Temperatur, Waschpuffer und Inkubationszeit .....	65
5.5.4	Bewertung der statistischen Signifikanz.....	68
5.6	Methadon .....	71
5.6.1	Intra- und Interassay-Präzision .....	71
5.6.2	Differenzierbarkeit der Ergebnisse.....	73
5.6.3	Einfluss der Temperatur, Inkubationszeit und des Waschpuffers .....	74
5.6.4	Bewertung der statistischen Signifikanz.....	77
5.7	Cannabinoide .....	80
5.7.1	Intra- und Interassay-Präzision .....	80
5.7.3	Die Differenzierbarkeit der Ergebnisse .....	82
5.7.4	Der Einfluss der Temperatur, Inkubationszeit und des Waschpuffers .....	83
5.7.5	Bewertung der statistischen Signifikanz.....	87
6	Zusammenfassung und Diskussion .....	90
6.1	Diskussion .....	90
6.1.1	Amphetamine .....	92
6.1.2	Benzodiazepine.....	92
6.1.3	Buprenorphine.....	93
6.1.4	Kokain .....	94
6.1.5	Methamphetamine .....	94
6.1.6	Methadon .....	95
6.1.7	Cannabinoide .....	95
6.2	Zusammenfassung.....	97

7 Glossar .....	99
8 Abbildungsverzeichnis.....	102
9 Literaturverzeichnis .....	109
10 Anhang.....	113

## I Abkürzungsverzeichnis

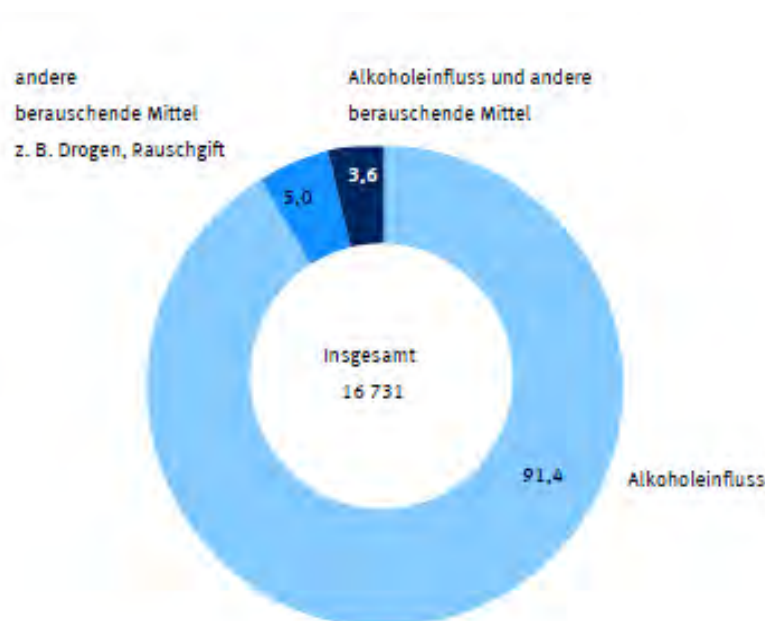
AMP	Amphetamin
BUP	Buprenorphin
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektroskopie
BZO	Benzodiazepin
COC	Kokain
cv	Variationskoeffizient [%]
EIA	Enzymimmunoassay
IVD	In Vitro Diagnostik
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektroskopie
LSD	Lysergsäurediethylamid
MDMA	3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin
MET	Methamphetamin
MTD	Methadon
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Wells o. Versuche
OD	Optische Dichte( keine Einheit)
S	Standardabweichung
THC	Cannabinoide/Cannabis
TMB	Tetramethylbenzidin

## 1 Einleitung und Zielsetzung

“Nach repräsentativen Studien rauchen 16 Millionen Menschen, 1,3 Millionen Menschen sind alkoholabhängig und Schätzungen legen nahe, dass 1,4 Millionen Menschen von Medikamenten abhängig sind. 600.000 Menschen weisen einen problematischen Cannabiskonsum auf, ein problematischer Konsum von anderen illegalen Drogen liegt bei 200.000 Menschen vor“ in Deutschland. [BUN 12]

Nach einer Statistik des deutschen Verkehrssicherheitsrates [DEU 13] starb im Jahr 2012 in Deutschland alle 146 Minuten ein Mensch und alle 81 Sekunden verunglückte ein Mensch im Straßenverkehr. Die Wahrscheinlichkeit eines Todesfalls bei einem Autounfall wird durch den Konsum von Alkohol oder anderen berauschenden Substanzen verdoppelt.

Abbildung 1 zeigt nach dem Statistischen Bundesamt [STA 12] Autounfälle mit Personenschaden 2011 in Deutschland bei denen mindestens ein Beteiligter unter dem Einfluss berauschender Substanzen stand.



**Abbildung 1: Unfälle mit Personenschaden im Jahr 2011 in %, bei welchen mindestens ein Beteiligter unter dem Einfluss von Alkohol oder illegalen Drogen stand. Insgesamt wurden im Jahr 2011, laut dem statistischen Bundesamt [SBA 12], 2,4 Millionen Unfälle von der Polizei registriert.**

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Ein weiterer Bereich, in dem der Konsum berauschender Substanzen zu schwerwiegenden Unfällen führen kann ist der Arbeitsplatz. Der Fokus liegt hierbei auf der Einhaltung der Sicherheit am Arbeitsplatz. Diese kann durch den Konsum bewusstseinsbeeinflussender Substanzen wie Alkohol, Drogen oder Medikamente erheblich beeinträchtigt werden, da die Konzentrationsfähigkeit, Reaktionsgeschwindigkeit und Risikobereitschaft in großem Umfang beeinflusst werden können. In Gefahrensituationen können Suchtkranke sich in einen Zustand versetzen, „durch den sie sich selbst oder andere gefährden können“ (BGV A1 §15). [WOL 12]

Des Weiteren besagt die Unfallverhütungsvorschrift BGV A1 §15 [DEU 04], dass ein Arbeitgeber verpflichtet ist, „Versicherte, die erkennbar nicht in der Lage sind, eine Arbeit ohne Gefahr für sich oder andere auszuführen“, nicht mit dieser Arbeit zu beschäftigen.

Die steigende Bereitschaft zum Konsum von Rauschmitteln im Alltag, demzufolge auch am Arbeitsplatz, erfordert eine steigende Kontrollrate durch den Arbeitgeber. Dieser Forderung steht jedoch der Schutz der Persönlichkeitsrechte und das Recht auf körperliche Unversehrtheit im Wege.

In Abbildung 2 wird eine Übersicht der pharmazeutischen Einteilung, Wirkung sowie einige Beispiele der geläufigsten berauschenden Substanzen in Deutschland gegeben. Diese soll dazu dienen, die Substanzen, welche in dieser Arbeit Erwähnung finden, zuzuordnen und deren Ausmaß auf die genannten Lebensbereiche abschätzen zu können.

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Gruppe	Wirkung	Substanzbeispiele
Stimulantia	<p>Stimmungssteigernd</p> <p>Leistungssteigernd</p> <p>Vermindertes Hungergefühl</p> <p>Vermindertes Schlafbedürfnis</p>	<p>Kokain</p> <p>Amphetamin</p> <p>Methamphetamin</p> <p>Ecstasy (MDMA)</p>
Sedativa	<p>Beruhigend</p> <p>Verlangsamte Wahrnehmungsfähigkeiten</p> <p>Herabsetzung der Koordination und Handlungsfähigkeit</p>	<p>Cannabis</p> <p>Benzodiazepine</p> <p>Opiate</p> <p>Alkohol</p> <p>Buprenorphine</p> <p>Methadon</p>
Narkotika	<p>Beruhigend</p> <p>Psychedelische Wirkungen</p> <p>In hohen Dosen narkotisierend</p>	<p>Fentanyl</p> <p>Ketamin</p> <p>Barbiturate</p>
Halluzinogene	<p>Veränderte Realitätswahrnehmung</p> <p>Mögliche Halluzinationen</p> <p>Verlangsamte Wahrnehmungsfähigkeiten</p>	<p>Cannabis</p> <p>LSD</p> <p>Muscimol</p>

Abbildung 2: pharmazeutische Einteilung von Drogen und Medikamenten [MAH 13]



## 1 Einleitung und Zielsetzung

Die „Arbeitsgruppe für Suchtanalytik“ der Schweiz (AGSA) hat in veröffentlichten Richtlinien eine Differenzierung der Bereiche, in denen die Drogendetektion eine wichtige Rolle spielt, vorgenommen [SCD 12] :

- Differentialdiagnostik: klinische Fragestellungen, Notfallmedizin, stationäre Diagnostik
- Substitutions- und/oder Entzugsbehandlung
- Forensische Fragestellungen: Konsum im Straßenverkehr, Strafrecht
- Suchtstoffanalytik am Ausbildungs- oder Arbeitsplatz

Durch stetig wachsende Probenaufkommen verlangt die In Vitro Diagnostik nach präzisen, verlässlichen und zeitsparenden Testverfahren. Hierfür sind Enzymimmunoassays, welche qualitative Ergebnisse bezüglich des Vorhandenseins der gesuchten Substanz liefern, vorrangig einsetzbar.

Die Ergebnisse dieser Analysemethode sind schneller und mit minimalem Geräteinsatz zu okkupieren als quantitative Aussagen mittels Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (GC/MS) oder Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie (LC/MS).

- GC/MS (Quantitative und qualitative Ergebnisse)
- LC/MS (Quantitative und qualitative Ergebnisse)
- EIAs (Qualitative Ergebnisse)

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Hersteller von Drogen-EIAs liefern Daten zu der Leistungsfähigkeit ihrer Produkte. Vertreiber und Anwender erstellen jedoch selbst diese Daten. Das gesammelte Fachwissen, sowie erprobte Versuchsdurchführungen bedingen Abweichungen der Leistungsdaten vom Anwender zu denen der Hersteller. Demnach ist eine selbstständige Datenerhebung notwendig. Im Anhang befindet sich eine Gebrauchsanleitung, wie sie dem Anwender geliefert wird.

Dieser Arbeitsaufwand soll dem Anwender entzogen werden, denn die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, Grenzen für Drogen-EIAs mittels einer statistischen Datenanalyse zu ermitteln.

Anhand der durchgeführten Versuche wurde

- eine Bewertung der Intra- und Inter-Assay-Präzision,
- eine Darstellung der statistischen Signifikanz und eine
- Beurteilung der Sensitivität erstellt.

Zusätzlich wurde der Einfluss

- der Temperatur,
- der Inkubationszeit und
- des Waschpuffers

auf die Tests geprüft.

Dies soll dem Fachpersonal Hinweise bezüglich der Umgebungstemperatur, der Inkubationszeit und des Waschpuffersystems geben um plausible und reproduzierbare Messergebnisse zu erlangen.

Aus Anwendersicht stellt die vorliegende Arbeit Anhaltspunkte dar, nach denen Plausibilitätskontrollen bezüglich der erhaltenen Ergebnisse durchgeführt werden können.

## 2 Die historische Entwicklung von Enzymimmunoassays

Die „Seitenketten-Theorie“ um 1897 von Paul Ehrlich ist als Grundstein der Immunologie, worauf EIAs basieren, zu betrachten. Dieser Theorie nach existieren Seitenketten an Antigenen, welche sich nach dem „Schlüssel- Schloss- Prinzip“ an Rezeptoren von Zellen binden.

Die toxophore Gruppe, der Seitenketten an Antigenen, wurde von Paul Ehrlich als toxischer Auslöser für die verringerte Funktionsfähigkeit oder gar Abtötung einer an ein Antigen gebundenen Zelle vermutet. Die natürliche Reaktion auf das Abtöten einer Zelle ist die Produktion „von Rezeptoren der betreffenden Art [...] was die immunisierende Wirkung eines Antigens erklärt.“ [WEL 92]. Bindet sich also ein Antigen an eine Zelle im Organismus, wird die Produktion von Antikörpern angeregt. Diese Antikörper besitzen spezifische Bindungsstellen für die jeweiligen Antigene und transportieren die, nach der Bindung unschädlich gemachten, Antigene aus dem Organismus heraus.

Im Jahr 1959 wurde von Salomon Aaron Berson<sup>1</sup> und Rosalyn Sussman Yalow<sup>2</sup> das erste Radioimmunoassay vorgestellt. Nach dieser Entdeckung erfolgte eine rasante Entwicklung auf dem Gebiet der Immunologie. Schon 1971 konnten nach [WEL 92] zwei unabhängig voneinander arbeitende schwedische Gruppen, unter Peter Perlmann<sup>3</sup> und Eva Engvall<sup>4</sup> den ersten EIA entwickeln.

Es ist nach dem Stand der Technik nicht mehr üblich ein EIA vollständig manuell zu pipettieren. Das Pipettieren der Proben und Reagenzien erfolgt für gewöhnlich voll automatisch in Analysegeräten. Hierbei sind eine erhöhte Präzision im Versuchsablauf und die Zeitersparnis vorteilhaft zu werten.

---

<sup>1</sup> Geb.: 1918 , gest.: 1972, US-amerikanischer Nuklearmediziner [THE 10]

<sup>2</sup> Geb.: 1921, gest.: 2011, US-amerikanische Physikerin, erhielt 1977 den Nobelpreis für Medizin [NOB 13]

<sup>3</sup> Geb.: 1919, gest.: 2005, schwedischer Immunologe [WIL 06]

<sup>4</sup> Geb.1940 , schwedische Wissenschaftlerin [SAN 13]

## 2 Die historische Entwicklung von Enzymimmunoassays

Substanz	Kalibrator-substanz	Messbereich in ng/ml	Untere Nachweisgrenze in ng/ml	Von Mahsan [MAH 11] empfohlener Cutoff	Vom Hersteller empfohlener Cutoff
Amphetamin	D-Amphetamin	0-500	5	25	100
Benzodiazepin	Oxazepam	0-500	1	10	100
Buprenorphin	Buprenorphin	0-5	0,25	0,5	1
Kokain	Benzoyllecgonin	0-300	1	10	50
Methamphetamin	D-Methamphetamin	0-500	5	25	100
Methadon	D-Methadon	0-100	1	5	5
THC (Cannabinoid)	11-nor- $\Delta^9$ -THC-9-COOH	0-50	1	2	10

**Abbildung 3: Der Messbereich, Untere Nachweisgrenze und Cutoffs (vom Hersteller empfohlen und vom Vertreiber empfohlene) von Inspec-Drogen- EIAs geordnet nach Substanzen nach [MAH 11]**

In Abbildung 3 ist eine Übersicht einiger Merkmale von Inspec-Drogen-EIAs der Firma Mahsan Diagnostika aufgeführt. Die untere Nachweisgrenze gibt die geringste Menge des jeweiligen Kalibrators an, welche im Untersuchungsvolumen mit EIAs detektiert werden können. Der Cutoff ist eine Entscheidungsgrenze, bei welcher zwischen positiven und negativen Ergebnissen unterschieden wird. Der Kalibrator ist eine Substanz, welche in dem Untersuchungsvolumen detektiert wird, nach dem Konsum der jeweiligen Drogen. Nach dem Konsum von beispielsweise Kokain wird im Urin Benzoyllecgonin, anstatt der Substanz Kokain selbst, nachgewiesen.

Hier wird eine Abweichung, wie in Kapitel 1 erwähnt wurde, innerhalb der angegebenen Leistungsfähigkeiten deutlich. Die vom Hersteller empfohlenen Cutoffs stimmen nicht mit denen vom Vertreiber, überein.

### 3. Grundlagen

## 3. Grundlagen

### 3.1 Funktionsprinzip

Antikörper werden im Organismus gebildet um Mikroorganismen erkennen und anschließend bekämpfen zu können [MAG 08]. Die Bildung von Antikörpern basiert auf dem Grundsatz der natürlichen oder der künstlich erworbenen Immunität. Immunität wird allgemein als ein Zustand bezeichnet, in dem die Abwehr von körperfremden Substanzen in einem Organismus erfolgt.

Die Unterteilung entsteht durch die Art und Weise des Erwerbs der Immunität. Die oben erwähnte natürliche Immunität besitzt ein Organismus von seiner Entstehung und bis zu dem ersten Kontakt mit pathogenen Keimen und Erregern. Durch ebendiesen Kontakt ist es einem Organismus möglich zu „lernen“. Er entwickelt nach [DOC 13] neue Arten der Antikörper um mit körperfremden Substanzen umgehen zu können, was als erworbene Immunität bezeichnet wird. Der Organismus entwickelt Antikörper gegen speziell diese hochmolekularen Substanzen, Antigene, und prägt sich deren strukturellen Aufbau ein. Um die Bildung von Antikörpern auszulösen müssen Antigene eine Größe von 5000 Dalton [MAG 08] mindestens aufweisen.

Drogen oder Medikamente gehören den niedermolekularen Molekülen an, wodurch die Mindestgröße für eine Antikörperbildung im Organismus nicht erreicht wird. Schlussfolgernd muss eine Kopplung an eine Trägersubstanz [RYC 03] erfolgen um eine Reaktion zu ermöglichen.

In der IVD-Analytik werden verschiedene Immunoassays genutzt. Radioimmunoassays (RIA), Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassays (FPIA), Cloned-Enzyme-Donor-Immunoassays (CEDIA) und Inspec-Enzymimmunoassays auf der Basis von Mikroplatten (EIA) sind die gebräuchlichsten Formen der Analyse im Fachlabor.

Die Reaktion zwischen Antikörper und bestimmten Komponenten des Antigens wird bei EIAs genutzt, indem ein Trägermedium mit einem passenden Antikörper beschichtet wird. Während der Analyse binden demnach die im Untersuchungsvolumen vorhandenen Antigene oder die zugegebenen Enzyme an die spezifischen Antikörper.

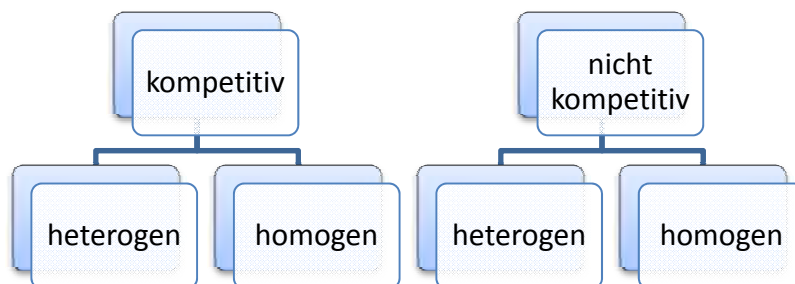
Heterogene Assays, wie sie im Folgenden verwendet wurden, werden in einem Waschschrift von freien Antikörpern gereinigt, während der Waschvorgang bei homogenen Assays entfällt. [RYC 03] Die Separation ist hierbei nicht nötig, da der erfolgte immunchemische Bindungsprozess ein physikalisch messbares Signal erzeugt [SEL 07].

### 3.1 Funktionsprinzip

Neben der Einteilung in heterogene und homogene Assays separiert man ebenfalls noch zwischen kompetitiven und nicht kompetitiven Assays, wie in Abbildung 4 ersichtlich ist.

In nicht kompetitiven Assays erhält das Antigen vor einem Waschschrift die Möglichkeit zur Bindung an den Antikörper. Nach dem Waschvorgang wird ein „Überschuss an enzymmarkierten Antikörpern (Antikörper mit Kreis als Enzym) gegen das Antigen inkubiert, dann wiederum ausgewaschen und die Messreaktion läuft am endgültig fixierten Antikörper ab.“ [RYC 03]

Kompetitive Assays zeichnen sich durch eine Konkurrenz zwischen Antigenen und markierten Antigenen um freie Antikörperbindungen aus. Kompetitive Assays wurden in dieser Arbeit verwendet. Die Messung erfolgt über die Enzymaktivität, welche bezüglich der Farbintensität umgekehrt proportional zu dem Gehalt der zu detektierenden Substanz im Untersuchungsvolumen ist. Je höher die optische Dichte, je dunkler also die Farbe, desto weniger Analyt ist in der Probe enthalten.



**Abbildung 4: Einteilung von EIAs nach Art und Weise der Ergebniserlangung und diesbezüglichen chemischen Reaktionen**

### 3.2 Testdurchführung laut Hersteller

#### **3.2 Testdurchführung laut Hersteller**

Vor der Durchführung, welche in Abbildung 6 vereinfacht schematisiert wird, müssen alle Testkomponenten, beschrieben in Kapitel 4.1.1, auf Raumtemperatur, 20°C-22°C, gebracht werden und ein Protokoll über die Zeitpunkte der einzelnen Schritte angefertigt werden.

Im ersten Schritt wird die benötigte Anzahl der Vertiefungen (Wells) in einem passenden Rahmen befestigt. Die ungenutzten Vertiefungen werden direkt wieder in die Isolierbeutel mit Klippverschluss verpackt und gekühlt. Anschließend werden jeweils 25 µl der Kalibratoren in die jeweiligen, vorher festgelegten, Vertiefungen pipettiert. Es werden Triplikate der Proben und Kalibratoren erstellt und die ersten 4 Reihen für die Erstellung der Standardkurve genutzt, wie in Abbildung 7 beispielhaft dargestellt wird. Zu den 25 µl Kalibratorsubstanz werden 100 µl Enzymkonjugat gegeben. Die Platte wird bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit zweifach destilliertem Wasser gewaschen. Die Platte wird drei Mal manuell gewaschen. Hierbei wird mit der Spritzflasche jedes Well mit der Waschlösung gefüllt, ausgeschüttelt und auf trockenem Papier aufgeklopft bis keine Flüssigkeit mehr ausgeworfen wird. Nach dem Waschvorgang werden 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung gegeben und wieder 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In Abbildung 8 zeigt sich, wie die Reagenzien nach diesem Schritt aussehen.

Nach Ablauf dieser Zeit wird die Reaktion mittels 100 µl Stopplösung beendet und innerhalb von 15 Minuten mit dem Photometer gemessen. Die Abbildung 9 zeigt eine Mikroplatte nach Zugabe von Stopplösung. Nach Ablauf dieser Zeit ist es möglich, dass die Farbgebung der Wells verändert wird und daraus folgend verfälschte Ergebnisse erlangt werden.

### 3.2 Testdurchführung laut Hersteller

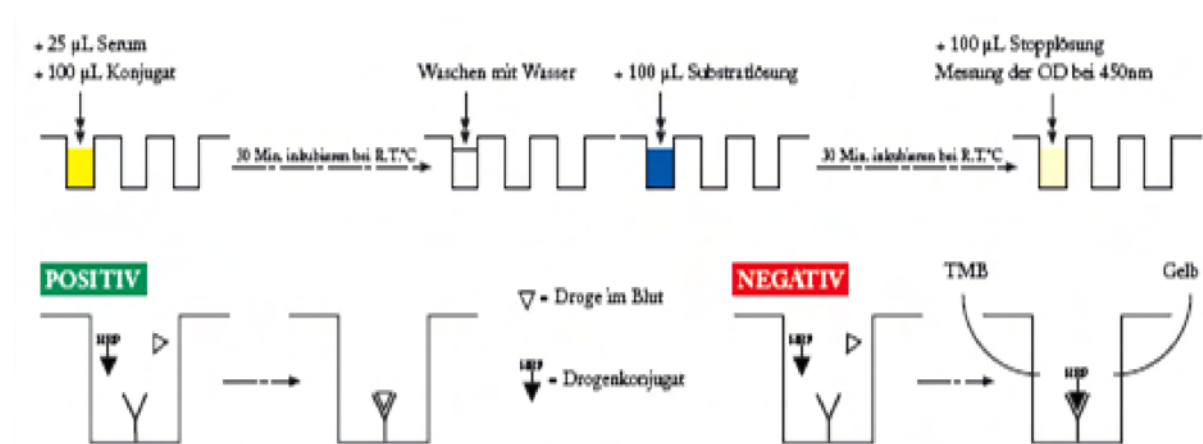


Abbildung 5: Schematische Darstellung des chemischen Prinzips eines EIAs bei der Versuchsdurchführung nach Mahsan [MAH 11]

Die Veränderung der Farbgebung wird durch die Farbreaktion der Substratlösung mit den entstandenen Antigen-Antikörper-Bindungen begründet, welche durch Stopplösung zwar unterbrochen wurde, jedoch nicht endgültig beendet wurde. Das ist der prinzipielle Versuchsablauf unter Normalbedingungen.

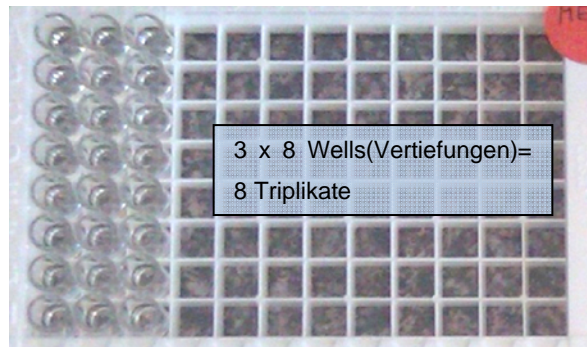
Um den Einfluss der Temperatur beurteilen zu können wurden Versuche parallel entweder bei 22°C oder bei 32°C durchgeführt und alle anderen Bedingungen wie unter Normalbedingungen belassen.

Die Beurteilung des Einflusses des Waschpuffers wurde auf die Durchführung von Versuchen am gleichen Tag entweder mit oder ohne den Gebrauch von Waschpufferlösung gestützt. Die Waschpufferlösung muss vor jedem Versuchsdurchlauf neu angesetzt werden mit dem Verdünnungsverhältnis 1:30 mit zweifach oder einfach destilliertem Wasser. Bei einem Wechsel zwischen entionisiertem Wasser ohne Waschpuffer und einer Waschpufferlösung, wird die Spritzflasche gespült und getrocknet um eine Kontamination zu verringern.

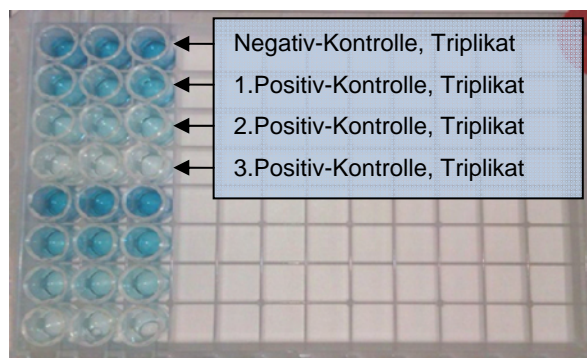
Um den Einfluss der Inkubationszeit vor dem Waschen zu beurteilen wurden Versuche an einem Tag mit sowohl 30 Minuten als auch 60 Minuten Inkubationszeit durchgeführt. Bei der Veränderung der Temperatur, Waschpufferlösung und Inkubationszeit wurde die gleiche Probenanordnung wie unter Normalbedingungen genutzt.



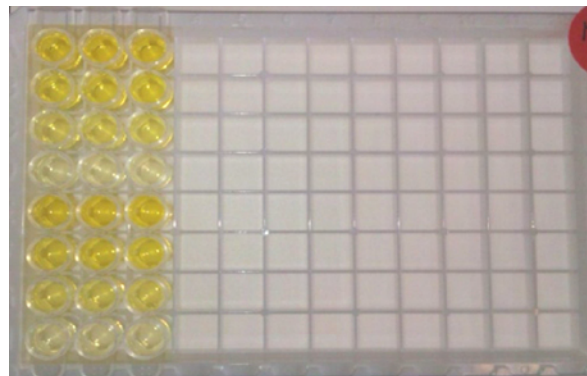
### 3.2 Testdurchführung laut Hersteller



**Abbildung 6:** Die Mikroplatte nach Zugabe der Kalibratoren, Proben sowie der Konjugatsubstanz. Hier wurden 8 Triplikate erstellt. Nach diesem Schritt wird die Platte 30 Min inkubiert und danach der Waschschrift vollzogen.



**Abbildung 7:** Die Mikroplatte nach dem Waschvorgang und nach Substratzugabe zeigt eine Blauverfärbung. Die Farbgebung ist umgekehrt proportional zu dem Gehalt der zu detektierenden Substanz im Probenvolumen.



**Abbildung 8:** Die Mikroplatte wird innerhalb von 15 Minuten mit dem Photometer gemessen und zeigt eine Gelbfärbung nach Zugabe der Stopplösung.

## 4. Material und Methoden

### 4. Material und Methoden

#### 4.1 Material

##### 4.1.1 Substanzen und Pufferlösungen

Für die Durchführung des EIAs werden verschiedene Reagenzien benötigt. Die verwendeten Mikroplatten erlauben eine Anwendung von Urin, Serum und Plasma als Untersuchungsmatrix. [MAH 11]

In dieser Arbeit werden Kalibratorlösungen als Proben verwendet. Diese beinhalten eine genau festgelegte Menge der Kalibratorsubstanz und werden bei jeder Analyse genutzt um eine Kalibrationskurve zu erstellen. Ein Kalibratorenset besteht aus einer Negativ-Kontrolle und drei unterschiedlich konzentrierten positiv-Kontrollen.

Zusätzlich zu den Proben wird ein substanzspezifisches markierendes Enzymkonjugat zugegeben. Dieses Droge-Merrettichperoxidase-Enzymkonjugat stellt Enzyme zur Bindung an die Antikörper zur Verfügung. An dieser Stelle ist es sehr wichtig das zu den Antikörpern passende Enzymkonjugat zu verwenden um eine Bindungsreaktion zu ermöglichen. Resultierend entsteht eine kompetitive Reaktion zwischen dem Enzymkonjugat und den in der Probe enthaltenen Drogen und Medikamenten.

Waschpufferlösungen dienen dazu überschüssige Komponenten nach erfolgter Bindungsreaktion zu entfernen. Ungebundene Antigene und Restbestandteile des Untersuchungsvolumens werden ausgewaschen und für die Reaktion schädliche pH-Werte werden gepuffert.

Durch die Zugabe von Substratlösung erfolgt die Farbreaktion der markierenden Enzym-Antikörperbindungen in einen blauen Farbton, siehe Abbildung 7. Bei der verwendeten Substratlösung handelt es sich um stark lichtempfindliches Tetramethylbenzidin. TMB gehört zu den Benzidinen dient bei EIAs als Nachweissubstanz für die Meerrettichperoxidase. Tetramethylbenzidin ist im Vergleich zu o-Phenylendiamin kaum kanzerogen und resultiert mit Merrettichperoxidase und Schwefelsäure zu einem „hoch empfindlichen Redoxsubstratsystem“. [TAM 02]

#### 4.1 Material

Die für die Tests verwendete Stopplösung ist 20%ige Schwefelsäure. Schwefelsäure ist eine stark ätzende Säure welche unter anderem die Farb- und Bindungsreaktionen in EIAs beendet. Durch die Farbreaktion des Tetramethylbenzidins mit Schwefelsäure zu einer gelben Lösung wird die photometrische Auswertung der Analyse ermöglicht.

Substrat, Konjugate, Platten und Kalibratoren sind bei 2°C-8°C zu lagern. Der Waschpuffer und die Schwefelsäure können bei Raumtemperatur gelagert werden. Die Mikroplatten selbst müssen luftdicht verpackt gelagert werden. Die Substratlösung muss vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt gelagert werden.

## 4.1 Material

### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die verwendeten Mikroplatten besitzen 12 Streifen mit jeweils acht Wells, siehe Abbildung 6. Bei jedem Versuch muss eine Kalibration durchgeführt werden, was im Regelfall durch die Dreifachbestimmung der 4 Kalibratoren erfolgt, siehe Abbildung 6. Bei der Dreifachbestimmung (Triplikatbestimmung) jeder Probe und der Erstellung der Kalibrationskurve können demnach 28 Proben analysiert werden.

Die für den Validierungsansatz genutzten Platten werden von dem Hersteller mit den erwähnten Antikörpern beschichtet und luftdicht verpackt. Die luftdichte Verpackung ist notwendig um eventuelle Störeffekte bei der Analyse durch Feuchtigkeit oder Oxidationsreaktionen zu vermeiden.

Das Photometer „TECAN Spectra II Microplate Reader“, wie in Abbildung 9 zu sehen, verfügt über die Möglichkeit Programme zur Auswertung zu speichern. Die Wahl von Filtern, Referenzfiltern, Anordnung der Proben und Festlegung der Kalibrationsstandards zur Berechnung der Probenkonzentrationen gehören zu den grundlegenden Variablen der Einstellungsmöglichkeiten. Der Filter wurde mit 450 nm und der Referenzfilter mit 620 nm für die Messung bestimmt. Die Probenanordnung, welche für die einzelnen Substanzen gewählt wurde, ist auf den zusammenfassenden Ergebnisbetrachtungen in Kapitel 5 zu sehen.

Zum Pipettieren der Probenlösungen wurden Eppendorf- Einkanalpipetten mit einstellbarem Volumen genutzt. Zum Pipettieren der Konjugate, des Substrats und der Stopplösung wurde eine Eppendorf-Multipette mit 5ml-Kombitips verwendet. Eine Spritzflasche diente bei den Versuchsdurchführungen zum Waschen der Mikrotiterplatten.



Abbildung 9: TECAN Spectra II Microplate Reader [LAB 13]

## 4.2 Methoden

### 4.2 Methoden

#### 4.2.1 Störeffekte

EIAs besitzen eine hohe Testsensitivität, sind aber anfällig für Störeffekte. Auch Umgebungstemperatur, Reagenzientemperatur, Inkubationszeiten, Kreuzreaktivitäten sowie Waschvorgänge können Störungen in den Tests bedingen. Die Auswirkungen dieser Einflüsse werden zum Teil in dieser Arbeit ansatzweise untersucht. In Kapitel 5 werden die Ergebnisse der Untersuchungen detailliert dargestellt.

Eine Auflistung von allen bedenklichen Ergebnissen, deren Ursachen sowie die Vermeidung dieser Störquellen ist in Abbildung 10 zu sehen.

Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Zu Hohe OD	Zu lange Inkubationszeiten (>30 Min) Ungenügende Waschschrte	Inkubationszeiten verkürzen (auf 30 Min) Waschpuffer prüfen/ Waschzyklen erhöhen
Zu flache Standardkurve erhalten (Differenz zwischen Negativ- und erstem Positiv-Kalibrator ist gering)	Inkubationszeiten zu kurz	Inkubationszeiten verlängern (auf 30 Min)
Schlechte Reproduzierbarkeit	ungenügende Waschschrte	Waschpuffer prüfen/ Waschzyklen erhöhen
Randeffekte (hohe S innerhalb der Triplikate)	Ungleichmäßige Temperatur auf der Platte	Unter konstanten Temperaturbedingungen arbeiten

Abbildung 10: Übersicht der Störfaktoren und deren Ursachen auf EIAs [LUT 09]

## 4.2 Methoden

### 4.2.2 Die Messung und Messwerte

Die Ergebnisse eines EIAs liegen in Form von Rohdaten vor. Diese müssen anhand einer Standardkurve, der Kenntnis von Fachpersonal und der substanzspezifischen Eigenschaften vorerst betrachtet werden um eine Aussage über das Vorhandensein des Analyten treffen zu können.

Bei der Programmierung des Photometers werden verschiedene Parameter festgelegt. Unter anderem unterliegt es dem Anwender die Substanzkonzentrationen der Kalibratoren als Standards zu fixieren um eine Berechnungsgrundlage zu schaffen. Anhand der Messung der Standards und deren vorgegebener Konzentration entsteht eine Standardkurve durch welche die Konzentration der Probenlösungen errechnet wird.

Der Messung folgen die Speicherung sowie ein Druck der Dokumentation der Ergebnisse. Als Resultat werden die optischen Dichten der einzelnen Proben, deren Mittelwert bei Triplikatabbestimmung, der zugehörige Variationskoeffizienten sowie die anhand der Eichkurve berechneten Konzentrationen der Proben angegeben. Ein Beispiel eines Ausdrucks ist im Anhang zu finden.

Ist die gemessene OD höher als die des Nullkalibrators, so kann das Gerät keine Berechnung bezüglich der Stoffkonzentration im Probenvolumen vornehmen. Resultierend aus dieser Tatsache ist die Untersuchung mittels EIA im Bereich der qualitativen Analytik einzuordnen. Es ist möglich anhand der Kalibrationskurve die Konzentration einer einzelnen Probe zu berechnen, jedoch werden die Berechnungen stark durch die Messbereiche und Messunsicherheiten der Ergebnisse begrenzt.

So ist das EIA nur in geringem Maße zu einer semiquantitativen und in keinem Falle quantitativen Aussage bezüglich der zu detektierenden Substanzen zu nutzen.

## 4.2 Methoden

### 4.2.3 Qualitätssicherung und Versuchsplan

Um Fehlinterpretationen für Anwender zu vermeiden, ist es unverzichtbar eine Begriffsdefinition bei der Grenzenermittlung von Immunoassays anzugeben. Diese findet sich detailliert im Glossar, Kapitel 7, dieser Arbeit.

Im Folgenden werden als Grundlagen zur Definition die „Richtlinien zur Suchtstoffanalytik“ von der Swiss Guidelines Committee for Drugs of Abuse Testing (SCDAT) genutzt [SCD 12]. Die SCDAT stützt sich bei der Begriffsdefinition auf folgende Schriften:

- Internationales Wörterbuch der Metrologie [DIN 10]
- Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie [GTF 09]
- Leitfaden zur Validierung chemisch-physikalischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit [JCG 08]

Diese Arbeit ist vor dem Hintergrund des Intended Use zu betrachten, da eine Darstellung der Grenzen von Enzymimmunoassays ohne die Kenntnis dessen nicht vollständig durchgeführt werden kann. [RAE 06]

Bei der Ermittlung von Grenzen von EIAs steht den Tests eine bestimmende Fragestellung voran, wonach das Assay entwickelt wurde. Diese Fragestellung bestimmt demzufolge den Umfang der Untersuchung und entspricht zeitgleich den Grundzügen des Intended Use.

## 4.2 Methoden

Die „Richtlinie 98/79/EU des europäischen Parlamentes und des Rates vom 27. Oktober 1998 über In Vitro Diagnostika“ [EUR 98] gibt Leistungsdaten von Analysen vor, während das SCDAT eine Reihe von Qualitätssicherungsmerkmalen aufzeigt. Bei der Validierung von In Vitro Diagnostik-Produkten schreiben die genannten Richtlinie und die SCDAT vor, welche Merkmale geprüft werden müssen.

Die Darstellung der betrachteten Merkmale erfolgt in Kapitel 5 in Tabellenform nach Substanz geordnet. In den Tabellen werden bei der Intra-Assay-Präzision die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Ergebnisse pro Versuch pro Konzentrationslevel in Prozent angezeigt.

Für die Inter-Assay-Präzision wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Versuche unter Normalbedingungen pro Konzentrationslevel berechnet und deren Variationskoeffizient in Prozent angegeben.

Um den Einfluss der Temperatur, Inkubationszeit und des Waschpuffers auf die Platten deutlich zu machen wurde in einer Tabelle jeweils ein Versuch unter Normalbedingungen einem der Versuche unter den jeweiligen variierenden Bedingungen gegenüber gestellt. Diese Gegenüberstellung wurde zusätzlich in einem Diagramm visualisiert. Um detaillierte Erkenntnisse bezüglich der Einflüsse der genannten Faktoren auf die EIAs zu erlangen, sind umfangreichere Tests nötig, auf welche jedoch in dieser Arbeit verzichtet wurden.

Um die Konfidenzintervalle darzustellen wurden die Mittelwerte der Versuche unter Normalbedingungen sowie die einfachen Konfidenzen der jeweiligen Konzentrationsebenen und deren Ober- und Untergrenze in Tabellenform dargestellt. Zur Visualisierung der Differenzierbarkeit der Ergebnisse wurden in Tabellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Versuche unter Normalbedingungen und mittels eines Diagramms zur Zusammenfassung abgebildet.



## 4.2 Methoden

### 4.2.4 statistische Datenanalyse

Für die Ermittlung der Grenzen der Leistungsfähigkeit von Enzymimmunoassays, ist es nötig Grundbegriffe der Statistik zu nutzen. Der hier vorgestellte Ansatz beruht auf dem induktiven Schluss, der einen Schluss von repräsentativen Stichproben auf die Allgemeinheit erlaubt. So wurden einzelne Mikroplatten, als Stichproben, entnommen um nach deren Bewertung die Ergebnisse und Aussagen auf die Grundgesamtheit anwenden zu können. [LUT 09] Die Grundgesamtheit umfasst alle produzierten Mikroplatten der jeweiligen Substanz des Herstellers.

In dieser statistischen Datenanalyse wird nur ein Merkmal der Mikroplatten, aber zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet. Daher sind die Stichproben als abhängig zu bezeichnen [RAE 06].

Das Signifikanzniveau beschreibt die Irrtumswahrscheinlichkeit für das Zutreffen einer zu Beginn gefassten Erwartung. Ein Unterschied zwischen den Testergebnissen unter gleichen Bedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten wird demnach mit der Wahrscheinlichkeit  $\alpha$  festgestellt. Zu Beginn dieser Arbeit wird erwartet, dass kein Unterschied zwischen Ergebnissen gleicher Bedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten besteht. In dieser Arbeit wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 32 % gewählt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  von 32% wird von Mahsan [MAH 11] als gebräuchlich bei der statistischen Bewertung von EIAs angegeben. Zusätzlich wird dadurch gewährleistet, dass alle Messergebnisintervalle der Konzentrationslevels ausreichend trennbar voneinander sind um eine eindeutige Differenzierung zwischen negativen und positiven Ergebnissen zu erhalten.

Der Mittelwert einer Messwertreihe wird bestimmt durch die Summe der Messwerte geteilt durch die Anzahl der Messwerte. Innerhalb der in diesem Kapitel genutzten Formeln wird der Mittelwert mit  $\bar{x}$  bezeichnet. Die Abkürzung MW in den Ergebnistabellen steht ebenfalls für den Mittelwert von ODs.

Die Standardabweichung wird mit der Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

n gibt die Anzahl der einfließenden Messwerte an,  $\bar{x}$  den Mittelwert der Messwerte und  $x_i$  einen einzelnen einfließenden Messwert.

## 4.2 Methoden

Der Variationskoeffizient ist eine Vergleichsmöglichkeit für die Streuung von Stichproben mit unterschiedlichen Mittelwerten [LUT 09]. Er wird mit folgender Formel berechnet:

$$cv = \frac{s}{\bar{x}}$$

Der Variationskoeffizient ist hiernach der prozentuale Anteil der Standardabweichung relativ zum Mittelwert.

Der wahre Wert einer Grundgesamtheit bezüglich eines Merkmals ist unbekannt. Er kann nur durch die vollständige Testung der Grundgesamtheit ermittelt werden. Bei einer Normalverteilung befindet sich, mit einer zuvor festgelegten Wahrscheinlichkeit [LUT 09], der wahre Wert innerhalb eines angegebenen Konfidenzintervalls.

Das Konfidenzintervall wird auch Vertrauensintervall- oder -Bereich genannt. Das Vertrauensniveau wurde in der vorliegenden Arbeit für die Konfidenzintervallberechnung von den vorhergehenden 32% Irrtumswahrscheinlichkeit auf 5% gesenkt und somit ist das Vertrauensniveau 95%.

Die Intervallgrenzen werden mit der Formel:

$$\bar{x} \pm \left(1 - \frac{\alpha}{2}\right) \frac{s}{\sqrt{n}}$$

berechnet [RAE 06].  $n$  ist die Anzahl der einfließenden Messwerte.

## 4.2 Methoden

In dieser Arbeit werden keine Messwerte aus der Statistik entfernt. Alle Ergebnisse sind Teil der Versuche, denn bei der Testdurchführung durch Anwender können so genannte Ausreißer nicht immer eindeutig identifiziert werden. Ausreißer werden als Teil der Testbedingungen im Labor des Anwenders angesehen.

In den im elektronischen Anhang befindlichen Wertetabellen werden alle Messwerte aufgeführt.

Da die betrachteten EIAs lediglich eine qualitative Aussage erlauben, wurde nur die Trennung (Differenzierbarkeit) zwischen Negativ- und Positivkalibratorintervall als entscheidend betrachtet. Um die Trennung der Ergebnissintervalle (MW-S und MW+S) bewerten zu können wurde aus den angegebenen optischen Dichten der Mittelwert sowie die Standardabweichung pro Konzentrationslevel gebildet.

In Abbildung 11 wird diese Vorgehensweise an einem Beispiel gezeigt.

Konzentration in ng/ml	MW	S	MW-S	MW+S
0	1,84	0,37	1,47	2,21
25	0,46	0,11	0,35	0,57
100	0,31	0,11	0,20	0,42
500	0,13	0,06	0,07	0,20

**Abbildung 11:** Die Werte von zwischen 0ng/ml und 25 ng/ml sind differenzierbar, da die Differenz zwischen beiden Ergebnissen größer 0 ist. Die Differenzierbarkeit zwischen 25 ng/ml und 100 ng/ml ist nicht gegeben, da die Differenz negativ ist. Die Differenzierbarkeit zwischen 100 ng/ml und 500 ng/ml ist nicht gegeben, da die Differenz 0 ist.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Amphetamine

Mit dem Inspec-EIA für Amphetamine wurden 6 Versuchsreihen durchgeführt. Die in die Bewertung eingehenden Chargen sind EK9647 und BK0073. Für Amphetaminmikroplatten wurden Kalibratoren mit den Konzentrationen 0 ng/ml, 25 ng/ml, 100 ng/ml und 500 ng/ml genutzt. Auf Seite 30 und 31 ist eine Zusammenfassung der Versuchsgrundlagen und daraus resultierenden Ergebnisse dargestellt. Diese soll einen möglichst schnellen Überblick über die erlangten Erkenntnisse bezüglich AMP-EIAs geben.

#### 5.1.3 Intra- und Interassay-Präzision

In Abbildung 12 ist die Intra-Assay-Präzision der Amphetamin-Mikroplatten zu sehen. Pro Tag wurde ein Versuch durchgeführt. An zwei Versuchstagen wurden zusätzlich von der 0 ng/ml-Kalibratorlösung sowie von der 25 ng/ml-Kalibratorlösung 24-fach-Bestimmungen durchgeführt. Das bedeutet, dass 24 Wells mit nur einer Kalibratorsubstanz getestet wurden. Demnach gibt n die Anzahl der pro Versuch gelieferten Messergebnisse wieder. Die Variationskoeffizienten der Amphetamin-EIAs liegen alle unter 20%. Daraus ist eine hohe Intra-Assay-Präzision der AMP-EIAs zu schließen. Die erste Versuchsreihe vom 2.5.2013 liegt in den optischen Dichten deutlich unter denen der anderen Versuche und ist als Ausreißer zu betrachten und leider nicht zu verhindern. Dies ist auf Pipettierungenauigkeiten zurückzuführen sowie ungenügende Waschvorgänge.

## 5.1 Amphetamine

Datum	0 ng/ml		25 ng/ml		100 ng/ml		500 ng/ml		n
	MW±S	cv	MW±S	cv	MW±S	cv	MW±S	cv	
02.05.13	0,90±0,10	10,67	0,24±0,01	5,24	0,15±0,01	4,87	0,06±0,00	7,63	6
07.05.13	1,78±0,10	5,76	0,48±0,03	5,52	0,37±0,03	9,24	0,13±0,01	9,30	6
08.05.13	1,90±0,13	6,88	0,55±0,07	12,42	0,32±0,01	3,50	0,13±0,01	5,19	6
16.05.13	1,67±0,14	8,52	0,48±0,02	5,03	0,30±0,03	10,87	0,12±0,02	12,36	6
23.05.13	2,08±0,11	5,18							24
11.06.13			0,41±0,04	9,28					24
25.07.13	1,91±0,33	17,37	0,53±0,05	9,08	0,35±0,03	7,38	0,10±0,01	14,71	6
26.07.13	1,87±0,10	5,53	0,66±0,05	7,08	0,44±0,04	8,68	0,24±0,01	6,03	6

**Abbildung 12: Intra-Assay-Präzision von Well zu Well unter Angabe von MA, S, cv und n der unabhängigen Versuche**

Die Abbildung 13 zeigt den Mittelwert, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten über alle Versuchstage, unter Normalbedingungen hinweg. Es zeigt sich, dass der Variationskoeffizient in nur zwei Konzentrationslevels unter 25% liegt und mit sinkender OD ansteigt. Dennoch ist eine genügend präzise Abgrenzung zu positiven Proben möglich.

Konzentration in ng/ml	n	MW	S	cv
0	7	1,84	0,37	20,23
25	7	0,46	0,11	24,75
100	6	0,31	0,09	29,35
500	6	0,13	0,06	42,80

**Abbildung 13: Inter-Assay-Präzision von Amphetamin-EIA-Versuchen anhand der Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten der Ergebnisse aller Versuche unter Normalbedingungen und Anzahl der Versuchstage**

## 5.1 Amphetamine

### 5.1.1 Differenzierbarkeit der Ergebnisse

In Abbildung 14 zeigt sich der Mittelwert aller Messergebnisse der Versuche unter Normalbedingungen sowie die Standardabweichung und Verteilung der Ergebnisse. Der Unterschied zwischen dem Mittelwert minus der Standardabweichung des Nullkalibrators und dem Mittelwert plus der Standardabweichung des ersten Positivkalibrators beträgt 0,89. Durch die ausreichende Differenzierung zwischen Nullkalibrator und erstem Positivkalibrator ist die Grundlage zur Erfüllung der Intended Use, der qualitativen Aussage bezüglich des Vorhandenseins der gesuchten Substanz, gegeben.

Konzentration in ng/ml	MW	S	MW-S	MW+S
0	1,84	0,37	1,46	2,21
25	0,46	0,11	0,34	0,57
100	0,31	0,11	0,19	0,42
500	0,13	0,06	0,07	0,19

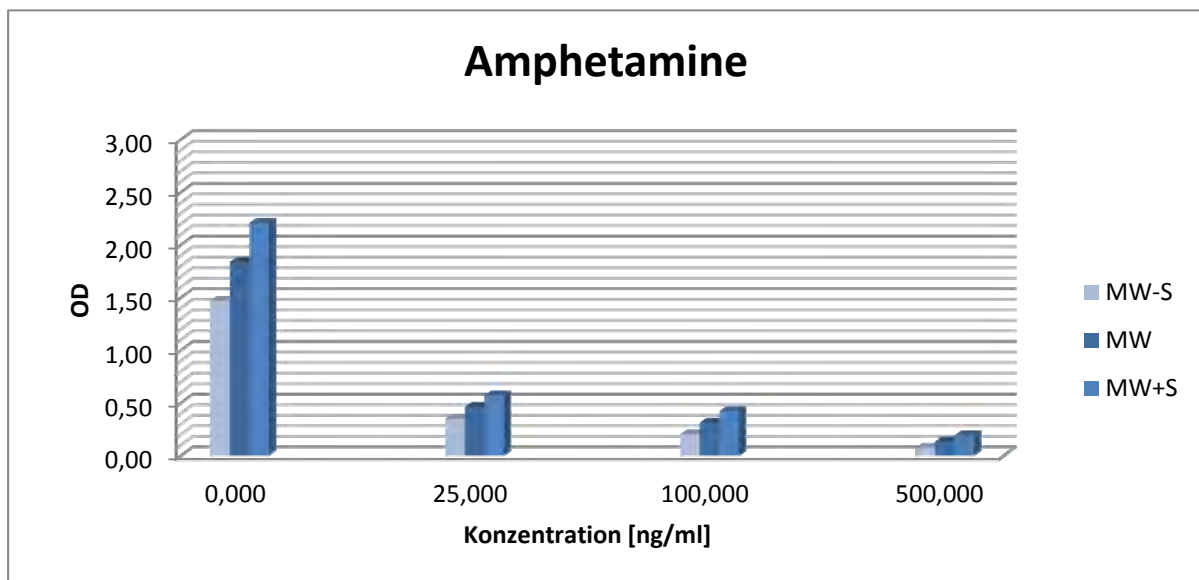


Abbildung 14: Differenzierbarkeit der Ergebnisse verschiedener Konzentrationslevel unter Angabe des Mittelwertes und dem 1S-Intervall der AMP-EIAs unter Normalbedingungen

## 5.1 Amphetamine

### 5.1.2 Einfluss der Inkubationszeit, Temperatur und des Waschpuffers

Bei der Untersuchung der Einflüsse von Inkubationszeit, Temperatur und Waschpuffersystem auf die optischen Dichten der Amphetaminplatten wurden jeweils zwei Versuchsdurchläufe durchgeführt.

So wurde beispielsweise an zwei verschiedenen Tagen jeweils eine Platte mit Waschpuffer gewaschen und jeweils eine ohne Waschpuffer in der Spüllösung gewaschen. Die im Folgenden visualisierten Darstellungen zeigen exemplarisch jeweils einen Versuchsdurchlauf um die Unterschiede zu verdeutlichen.

In Abbildung 15 ist ein Vergleich zwischen einer Versuchsreihe mit und einer Serie ohne Waschpuffer ersichtlich.

Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0	1,71	2,78	1,94	5,43
25	0,68	0,76	0,49	4,65
100	0,45	1,33	0,26	2,90
500	0,25	3,08	0,10	7,78
	Mit Waschpuffer		Ohne Waschpuffer	

**Abbildung 15: Versuchsserien bei Amphetamin-EIAs mit und ohne Waschpuffer durch Angabe der mittleren optischen Dichte der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuchsdurchlauf**

Die Verwendung von Waschpuffer erhöht die ODs der AMP-EIAs nicht deutlich und eindeutig. Somit ist der Einfluss des Waschpuffers auf die Amphetamin-EIAs als gering zu betrachten.

Abbildung 16 zeigt eine Anhebung der optischen Dichte bei erhöhter Umgebungstemperatur. In dem Fall der Amphetaminmikrotiterplatten ist es nicht gelungen eindeutig einen Zusammenhang zwischen der Umgebungstemperaturänderung und der Änderung der optischen Dichte zu zeigen. Der zweite Versuch diesbezüglich lieferte höhere ODs der Platten bei 22°C als bei 32°C. Es wurde darauf verzichtet weitere Versuche zur Feststellung signifikanter Unterschiede durchzuführen.

## 5.1 Amphetamine

Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0	2,09	3,51	1,61	2,27
25	0,72	7,00	0,49	3,30
100	0,54	8,61	0,28	1,92
500	0,27	4,60	0,16	10,82
	Bei 31°C Umgebungstemperatur		Bei 22°C Umgebungstemperatur	

**Abbildung 16: Versuchsserien bei 31°C und 22°C Umgebungstemperatur unter Angabe der mittleren optischen Dichte der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuchsdurchlauf**

Der Einfluss der Inkubationszeit auf die ODs der Amphetaminassays ist in Abbildung 17 dargestellt. Es wird offensichtlich, dass die Erhöhung der Wartezeit vor dem Waschschrift eine Anhebung der Ergebnisse bedingt. In der Wiederholung sahen die Veränderungen ähnlich aus.

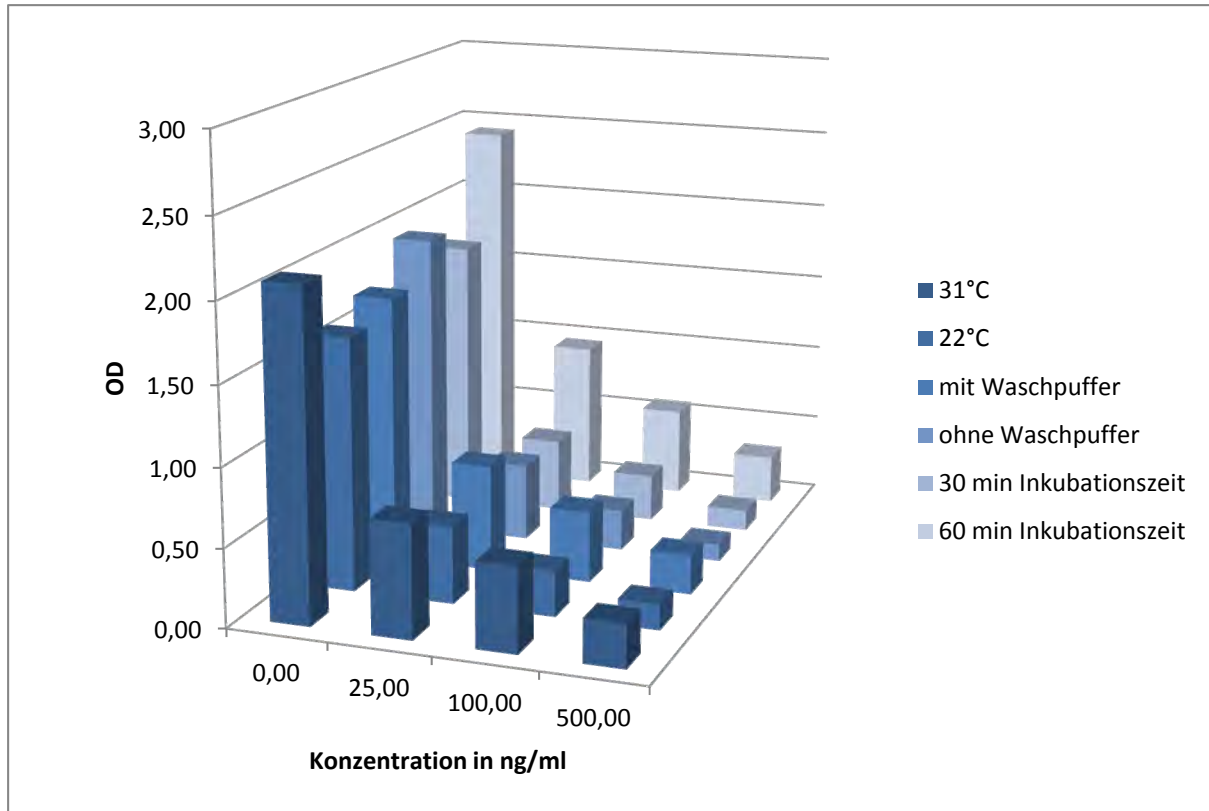
Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0	1,75	8,34	2,42	5,69
25	0,47	6,52	0,95	0,18
100	0,30	0,99	0,57	11,47
500	0,13	6,13	0,31	10,85
	30 min Inkubationszeit		60 min Inkubationszeit	

**Abbildung 17 Auswirkung der Inkubationszeit auf die optische Dichte, dargestellt durch die mittleren ODs sowie Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse des jeweiligen Tests**



## 5.1 Amphetamine

Fazit ist, dass die Amphetamin-Mikroplatten als robust gegenüber Waschpuffer und Umgebungstemperatur zu bezeichnen sind. Die Platten reagieren bei der Änderung der Inkubationszeit mit außerordentlichen Schwankungen. Anwender müssen berücksichtigen, dass die Versuchsbedingungen laut Hersteller eingehalten werden müssen, da ansonsten Messwerte außerhalb des Messbereichs einiger Photometer erreicht werden können.



**Abbildung 18: Darstellung der optischen Dichten unter verschiedenen Testbedingungen pro Konzentrationslevel**

## 5.1 Amphetamine

### 5.1.4 Bewertung der statistischen Signifikanz

Die statistische Signifikanz, welche in Kapitel 4 definiert wird, zwischen allen Konzentrationsniveaus ist nach der Abbildung 19 gegeben. Nach der Abbildung 19 befinden sich schlussfolgernd die wahren Werte der Konzentrationslevel-Grundgesamtheiten mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit in den dargestellten Konfidenzintervallen. Unter Einhaltung der vom Hersteller vorgegebenen Testbedingungen ist es möglich mit den verwendeten Platten Konfidenzintervalle zu erhalten, die statistisch signifikant unterschiedlich voneinander sind.

Konzentration	Konfidenz	Konfidenzintervall: MW±Konfidenz	Obergrenze	Untergrenze
0 ng/ml	0,09	1,84±0,09	1,93	1,74
25 ng/ml	0,03	0,46±0,03	0,49	0,43
100 ng/ml	0,03	0,32±0,04	0,34	0,28
500 ng/ml	0,02	0,13±0,02	0,15	0,11

Abbildung 19: Darstellung des Konfidenzintervalls der Amphetaminmikroplatten und die sich dadurch ergebenden Intervallgrenzen mit  $\alpha=0,05$  (siehe Kapitel 4)

## 5.1 Amphetamine

### AMP-Enzymimmunoassay

Kalibratorsubstanz: D-Amphetamin

Cutoff: 25 ng/ml

Untere Nachweisgrenze mittels EIA: 5 ng/ml

Messbereich im EIA: 0-500 ng/ml

Pipettierschema der Proben und Kalibratoren in ng/ml eines Versuchs:

Testbedingungen laut Hersteller:

	A	B	C	D
1	0	0	0	Kalibratorsubstanzen zur Erstellung der Kalibrationskurve
2	25	25	25	
3	100	100	100	
4	500	500	500	
5	0	0	0	Native Probenvolumina, in diesem Fall Kalibratorsubstanzen
6	25	25	25	
7	100	100	100	
8	500	500	500	

- Raumtemperatur ( 22°C)
- Keine Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- 30 Min Inkubationszeit

Zur Ermittlung der Einflüsse wurden folgende Testbedingungen verändert:

- Raumtemperatur auf 31°C erhöht
- Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 Min

Konzentration	n	MW	S	cv in %	MW+S	MW-S	Proben in diesem Bereich sind	MW	cv in%	MW	cv in%	MW	cv in %	
0 ng/ml	7	1,84	0,37	20,23	2,21	1,46	Negativ	2,09	3,51	2,42	5,69	1,71	2,78	
25 ng/ml	7	0,46	0,11	24,75	0,57	0,34	Cutoff	0,72	7,00	0,95	0,18	0,68	0,76	
100 ng/ml	6	0,31	0,09	29,35	0,42	0,19	Positiv	0,54	8,61	0,57	11,47	0,45	1,34	
500 ng/ml	6	0,13	0,06	42,80	0,19	0,07	Positiv	0,27	4,60	0,31	10,85	0,25	3,09	
		Inter-Assay-Präzision							Beispiel bei 31°C Raumtemperatur		Beispiel Mit 60 Min Inkubationszeit		Beispiel unter Nutzung von Waschpuffer	

## 5.1 Amphetamine

<b>Intra-Assay-Präzision:</b>	1	<b>Einfluss des Waschpuffers:</b>	→ D
<b>Inter-Assay-Präzision:</b>	3	<b>Einfluss der verlängerten Inkubationszeit:</b>	Ca.87% → A+
<b>Differenzierbarkeit der Ergebnisse:</b>	3	<b>Einfluss der erhöhten Umgebungstemperatur:</b>	→ D
<b>Signifikanz (Konfidenzintervalle):</b>	2		

*Es wird der Mittelwert der jeweiligen Konzentrationslevel eingesetzt und daraus ein Mittelwert gebildet, wenn beide Versuche diesbezüglich eine Veränderung der Werte nach sich zog.*

1-max. cv in % < 20% oder sehr gut

$$\mathbf{A+} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 60\% \text{ (sehr hoher Einfluss)}$$

2- max. cv in % < 30% oder gut

$$\mathbf{A-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 40\% \text{ (hoher Einfluss)}$$

3- max. cv in % ≤ 45% oder befriedigend

$$\mathbf{B-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 20\% \text{ (wenig Einfluss)}$$

4- max. cv in % > 45% oder ausreichend

$$\mathbf{C-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) \leq 20\% \text{ (kaum Einfluss)}$$

5- max. cv in % > 65% oder ungenügend

**D-** nicht eindeutig nachweisbarer Einfluss

### 5.2 Benzodiazepine

Mit der Benzodiazepin-EIA-Mirkotiterplatte wurden 6 Versuchsdurchläufe mit den Plattenchargen BK0074 und EK9649 ausgeführt. Zusätzlich wurden zwei Versuche mit einer 24-fach-Bestimmung der Kalibratoren 0 ng/ml und 100 ng/ml durchgeführt. Die Versuche wurden hierbei mit Kalibratoren der Konzentrationslevel 0 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 500 ng/ml bearbeitet. Im elektronischen Anhang sind die Wertetabellen im Einzelnen dargestellt. Auf Seite 40 und 41 ist eine Zusammenfassung der Versuchsgrundlagen und daraus resultierenden Ergebnisse dargestellt. Diese soll einen möglichst schnellen Überblick über die erlangten Erkenntnisse bezüglich BZO-EIAs geben.

#### 5.2.1 Intra- und Interassay-Präzision

In Abbildung 20 zeigt sich, dass die Präzision von den pro Tag ausgeführten Versuchen sehr gut ist. Pro Tag wurde ein Versuch durchgeführt. Somit gibt  $n$  die Anzahl der in die Berechnung einfließenden Werte an, die pro Versuchstag generiert wurden. Die Variationskoeffizienten liegen, bis auf drei am 26.7.2013, unter 25%. Wie auch bei den Amphetaminmikroplatten erzielen die hoch konzentrierten Kalibratoren die höchsten Variationskoeffizienten mit über 35%. Die Schwankungen von Well-zu-Well der BZO-EIAs sind als vergleichsweise gering anzusehen und in den Wertetabellen der Versuche zu Benzodiazepin-Mikroplatten dargestellt.

## 5.2 Benzodiazepine

Datum	0 ng/ml		10 ng/ml		100 ng/ml		500 ng/ml		n
	MW±S	cv	MW±S	cv	MW±S	cv	MW±S	cv	
02.05.13	2,30±0,12	5,41	1,33±0,12	9,36	0,53±0,05	9,36	0,23±0,02	10,47	6
07.05.13	2,12±0,25	11,85	1,13±0,11	10,06	0,40±0,02	5,66	0,18±0,01	4,60	6
08.05.13	2,19±0,15	7,05	1,24±0,06	5,25	0,50±0,06	12,16	0,18±0,03	18,49	6
16.05.13	1,96±0,23	11,82	1,16±0,12	12,92	0,52±0,12	22,80	0,19±0,03	13,65	6
23.05.13	1,99±0,42	20,91							24
11.06.13					0,43±0,09	19,90			24
25.07.13	2,18±0,45	20,52	1,29±0,15	11,41	0,46±0,05	10,72	0,24±0,06	24,06	6
26.07.13	2,01±0,52	25,90	1,42±0,17	11,91	0,61±0,19	30,34	0,35±0,13	35,85	6

**Abbildung 20: Darstellung der Intra-Assay-Präzision pro Tag als Variationskoeffizient in Prozent durch Angabe der Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten und Anzahl der Ergebnisse des Versuchs des jeweiligen Tages**

## 5.2 Benzodiazepine

Die Variationskoeffizienten aller Versuche, einzusehen in Abbildung 21, unter Normalbedingungen liegen unter 25% bis auf den der 500 ng/ml-Kalibratorlösung. Auch in diesem Fall steigen die Variationskoeffizienten mit sinkender OD. Es ist festzustellen, dass die Inter-Assay-Präzision sehr hoch ist. Die Anzahl der einfließenden Versuchstage, wird hier mit n angegeben.

Konzentration in ng/ml	n	MW	S	cv
0	7	2,07	0,37	17,61
10	6	1,26	0,16	12,61
100	7	0,50	0,11	22,39
500	6	0,23	0,08	36,13

**Abbildung 21: Die Inter-Assay-Präzision aller Versuche unter wird angegeben durch den Mittelwert, die Standardabweichung, den daraus folgenden Variationskoeffizienten und die Anzahl der einfließenden Versuche unter Normalbedingungen**

## 5.2 Benzodiazepine

### 5.2.2 Differenzierbarkeit der Ergebnisse

Betrachtet man die Ergebnisse der Versuche mit Benzodiazepin-EIAs wie in Abbildung 22 so zeigt sich, dass eine klare Differenzierbarkeit der Intervalle gegeben ist. Der Unterschied zwischen negativ- und positiv-Kalibrator beträgt 0,28. Aus Anwendersicht ist diese Differenz als ausreichend zu betrachten. Bei den in Abbildung 22 dargestellten Intervallen ergibt sich keine Überschneidung zwischen den Kalibratorniveaus. Mit steigender OD sinken die Unterschiede zwischen den Intervallen.

Konzentration	MW	S	MW-S	MW+S
0 ng/ml	2,07	0,37	1,70	2,44
10 ng/ml	1,26	0,16	1,10	1,42
100 ng/ml	0,50	0,11	0,39	0,61
500 ng/ml	0,23	0,08	0,15	0,31

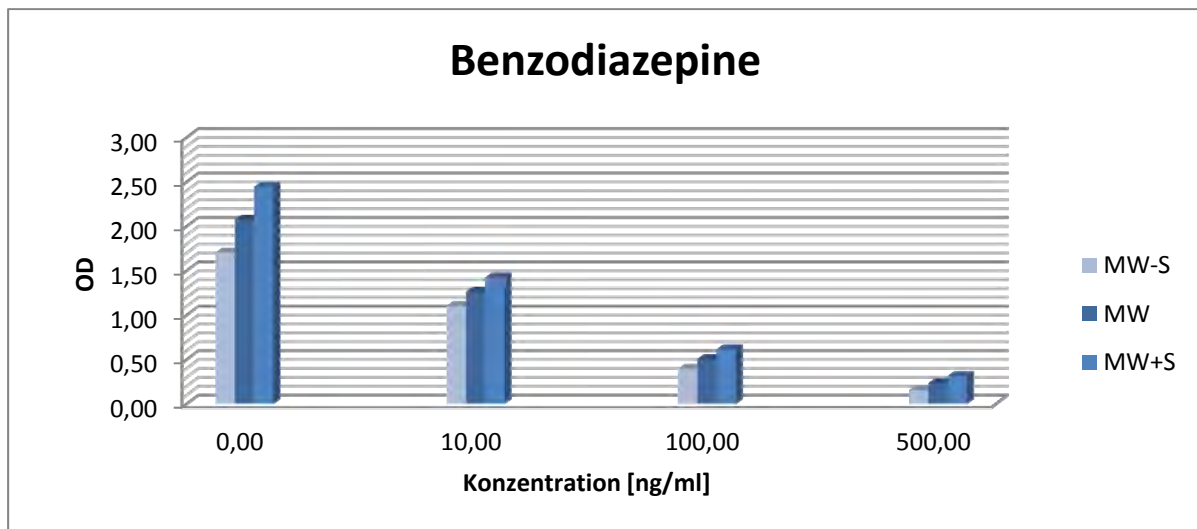


Abbildung 22: Differenzierbarkeit der Ergebnisse anhand des Mittelwertes der OD aller Versuche unter Normalbedingungen dargestellt anhand einer Wertetabelle sowie einem Balkendiagramm um die Differenzierbarkeit der Ergebnis-Intervalle zu visualisieren



## 5.2 Benzodiazepine

### 5.2.3 Einfluss der Temperatur, Inkubationszeit und des Waschpuffers

Unter Einfluss der Inkubationszeit verändern sich bei Benzodiazepin-Mikrotiterplatten die optischen Dichten signifikant. In Abbildung 23 zeigt sich, dass eine Steigerung der Inkubationszeit auf 1 h, abweichend der Herstellerempfehlung, eine Erhöhung der optischen Dichten mit sich bringt. Die OD des Nullkalibrators nach 30 Minuten Inkubationszeit ist sogar kleiner als die OD der 10 ng/ml-Kontrolle nach einer Stunde Inkubationszeit. Der Wert der optischen Dichte nach der Verdopplung der Inkubationszeit verdoppelt sich annähernd in dem betrachteten Fall. Nach der Mehrfachdurchführung dieses Versuchs kann eindeutig festgestellt werden, dass eine Steigerung der Inkubationszeit eine annähernd proportionale Erhöhung der optischen Dichten verursacht.

Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0	3,32	2,18	1,77	11,62
10	2,08	16,63	1,05	6,20
100	0,97	6,40	0,45	11,47
500	0,54	6,37	0,22	7,62
	60 min Inkubationszeit		30 min Inkubationszeit	

**Abbildung 23: Der Einfluss der Inkubationszeit auf die optischen Dichten der Benzodiazepin-EIAs durch Darstellung der Mittelwerte der ODs pro Versuch der jeweiligen Versuchsbedingung**

Im Verlauf der Testauswertungen konnte kein direkter Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Ergebnisse der Benzodiazepin-Platten ausgemacht werden. Bei jeweils zwei Durchführen ergaben sich einerseits eine proportionale Steigerung der optischen Dichten mit der Temperatur und andererseits niedrigere Ergebnisse bei hoher Temperatur.

## 5.2 Benzodiazepine

Konzentration	OD	cv	OD	cv
0,000	3,03	2,30	2,39	1,54
10,000	1,90	11,70	1,50	14,47
100,000	0,71	3,09	0,57	8,19
500,000	0,39	5,19	0,28	34,72
	31°C Raumtemperatur		22°C Raumtemperatur	

**Abbildung 24: Versuchsserien bei 31°C und 22°C Umgebungstemperatur unter Angabe der mittleren optischen Dichte und deren cv der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuchsdurchlauf**

Es besteht jedoch weiterhin die Annahme dass es einen Zusammenhang zwischen Umgebungstemperatur und den optischen Dichten gibt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf eine weitergehende umfangreiche Untersuchung verzichtet.

Bei der Verwendung von Waschpuffer ist keine deutliche Erhöhung der Werte zu erwarten. In der Wiederholung des Versuchs wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

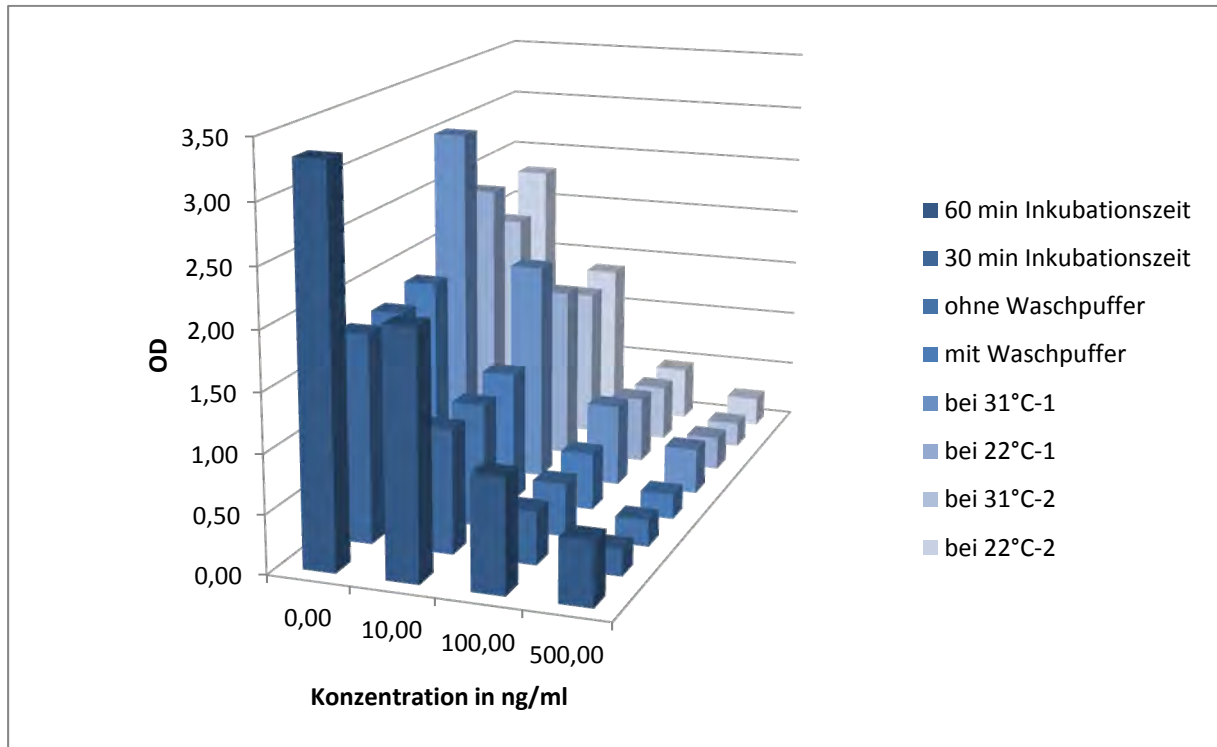
In Abbildung 25 sind zwei exemplarische Versuche abgebildet, die die Veränderung der Werte unter Anwesenheit oder Abwesenheit von Waschpuffer in der Spüllösung verdeutlichen. Die Abweichungen von Well zu Well, was sich im Variationskoeffizienten widerspiegelt, sinken.

Konzentration	OD	cv	OD	cv
0,000	1,77	11,62	1,86	0,89
10,000	1,05	6,20	1,12	3,50
100,000	0,45	11,47	0,50	10,20
500,000	0,22	7,62	0,21	3,08
	Ohne Waschpuffer		Mit Waschpuffer	

**Abbildung 25: Vergleich von Versuchen mit Benzodiazepin-EIAs mit und ohne Waschpuffer unter Angabe der Mittelwerte der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuch und den daraus entstehenden Variationskoeffizienten**

## 5.2 Benzodiazepine

Die Robustheit von den Benzodiazepin-EIAs ist nach den erwähnten Testdurchläufen als gut zu bezeichnen. Nur die Verlängerung der Inkubationszeit konnte einen eindeutigen Einfluss auf die Ergebnisse nehmen.



**Abbildung 26: Darstellung der optischen Dichten unter verschiedenen Testbedingungen pro Kalibratorlevel**

## 5.2 Benzodiazepine

### 5.2.4 Bewertung der statistischen Signifikanz

Konzentration	Konfidenz	Konfidenzintervall MW±Konfidenz	Obergrenze	Untergrenze
0 ng/ml	0,09	2,07±0,09	2,17	1,98
10 ng/ml	0,05	1,26±0,05	1,31	1,21
100 ng/ml	0,03	0,50±0,03	0,53	0,47
500 ng/ml	0,03	0,23±0,03	0,25	0,20

**Abbildung 27: Darstellung der Konfidenzintervalle der BZO-EIAs unter Angabe der Intervallgrenzen zur Verdeutlichung des signifikanten Unterschieds der Intervalle**

Nach Abbildung 27 sind die zusammenfassenden Ergebnisse der Benzodiazepin-Mikrotiterplatten unter normalen Testbedingungen als statistisch signifikant bewertbar. Die Intervalle der Konzentrationslevel überschneiden sich in keinem Fall. In dem vorliegenden Fall handelt es sich um sehr geringe Konfidenzen sodass die Benzodiazepin-EIAs als vertrauenswürdig und sicher als Nachweismethode bezeichnet werden können.

## 5.2 Benzodiazepine

### BZO-Enzymimmunoassay

**Kalibratorsubstanz:** Oxazepam

**Cutoff:** 10 ng/ml

**Untere Nachweisgrenze mittels EIA:** 1 ng/ml

**Messbereich im EIA:** 0-500 ng/ml

**Pipettierschema der Proben und Kalibratoren in ng/ml eines Versuchs:**

**Testbedingungen laut Hersteller:**

	A	B	C	D
1	0	0	0	Kalibratorsubstanzen zur Erstellung der Kalibrationskurve
2	10	10	10	
3	100	100	100	
4	500	500	500	
5	0	0	0	Native Probenvolumina, in diesem Fall Kalibratorsubstanzen
6	10	10	10	
7	100	100	100	
8	500	500	500	

- Raumtemperatur ( 22°C)
- Keine Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- 30 Min Inkubationszeit

**Zur Ermittlung der Einflüsse wurden folgende Testbedingungen verändert:**

- Raumtemperatur auf 31°C erhöht
- Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 Min

Konzentration	n	MW	S	cv in %	MW+S	MW-S	Proben in diesem Bereich sind	MW	cv in%	MW	cv in%	MW	cv in %
0 ng/ml	7	2,07	0,37	17,61	2,44	1,70	Negativ	3,03	2,30	3,32	2,18	1,86	0,89
10 ng/ml	6	1,26	0,16	12,61	1,42	1,10	Cutoff	1,90	11,70	2,08	16,63	1,12	3,50
100 ng/ml	7	0,50	0,11	22,39	0,61	0,39	Positiv	0,71	3,09	0,97	6,40	0,50	10,20
500 ng/ml	6	0,23	0,08	36,13	0,31	0,15	Positiv	0,39	5,19	0,54	6,37	0,21	3,08
Inter-Assay-Präzision								Beispiel bei 31°C Raumtemperatur	Beispiel Mit 60 Min Inkubationszeit	Beispiel unter Nutzung von Waschpuffer			

Intra-Assay-Präzision:	3	Einfluss des Waschpuffers:	→ D
Inter-Assay-Präzision:	3	Einfluss der verlängerten Inkubationszeit:	Ca. 59% → A
Differenzierbarkeit der Ergebnisse:	1	Einfluss der erhöhten Umgebungstemperatur:	→ D
Signifikanz (Konfidenzintervalle):	1		

Es wird der Mittelwert der jeweiligen Konzentrationslevel eingesetzt und daraus ein Mittelwert gebildet, wenn beide Versuche diesbezüglich eine Veränderung der Werte nach sich zog.

1-max. cv in % < 20% oder sehr gut

$$\mathbf{A+} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 60\% \text{ (sehr hoher Einfluss)}$$

2- max. cv in % < 30% oder gut

$$\mathbf{A-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 40\% \text{ (hoher Einfluss)}$$

3- max. cv in % ≤ 45% oder befriedigend

$$\mathbf{B-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 20\% \text{ (wenig Einfluss)}$$

4- max. cv in % > 45% oder ausreichend

$$\mathbf{C-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) \leq 20\% \text{ (kaum Einfluss)}$$

5- max. cv in % > 65% oder ungenügend

**D-** nicht eindeutig nachweisbarer Einfluss

### 5.3 Buprenorphine

Für die Ergebnisgenerierung der Buprenorphin-EIAs wurden insgesamt 5 Versuche durchgeführt. Hierbei wurden die Chargen *BK0078* und *EK9664* genutzt und die Versuchsdurchläufe unter Normalbedingungen durchgeführt. In den Wertetabellen im elektronischen Anhang sind die einzelnen Ergebnisse dargestellt. Die Versuche wurden hierbei mit Kalibratoren der Konzentrationslevel 0 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml und 5 ng/ml bearbeitet. Auf Seite 51 und 52 ist eine Zusammenfassung der Versuchsgrundlagen und daraus resultierenden Ergebnisse dargestellt. Diese soll einen möglichst schnellen Überblick über die erlangten Erkenntnisse bezüglich BUP-EIAs geben.

#### 5.3.3 Intra- und Interassay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision wird in Abbildung 28 dargestellt. Die Anzahl der einfließenden Ergebnisse pro Versuchstag wird mit n angegeben.

An zwei Versuchstagen wurden von der 0 ng/ml-Kalibratorlösung sowie von der 0,5 ng/ml-Kalibratorlösung 24-fach-Bestimmungen durchgeführt. Das bedeutet, dass 24 Wells mit nur einer Kalibratorsubstanz getestet wurden. Die Variationskoeffizienten liegen, bis auf zwei, unter 15%. Wie auch bei den Amphetaminmikrotiterplatten erzielen die hoch konzentrierten Kalibratoren die höchsten Variationskoeffizienten mit über 20%. Die Abbildung zeigt, dass die BUP-EIAs geringe Schwankungen innerhalb eines Versuchs aufweisen und somit den Intended Use, die eindeutige Detektion von bestimmten Substanzen im Untersuchungsvolumen.

### 5.3 Buprenorphine

Datum	0 ng/ml		0,5 ng/ml		1 ng/ml		5 ng/ml		n
	MW±S	cv	MW±S	cv	MW±S	cv	MW±S	cv	
020.5.13	2,18±0,10	4,45	0,59±0,09	14,86	0,36±0,03	7,21	0,12±0,01	4,86	6
07.05.13	2,33±0,10	4,19	0,69±0,03	4,41	0,41±0,01	2,31	0,14±0,01	5,99	6
16.05.13	2,06±0,08	3,81	0,62±0,06	10,10	0,40±0,06	14,65	0,14±0,01	10,04	6
23.05.13	1,85±0,08	4,58							24
11.06.13			0,61±0,03	5,62					24
25.07.13	1,14±0,03	2,30	0,37±0,03	7,46	0,20±0,01	30,67	0,08±0,02	25,99	6
26.07.13	1,00±0,06	6,33	0,36±0,03	7,56	0,23±0,06	5,59	0,11±0,01	7,71	6

**Abbildung 28: Intra-Assay-Präzision von Well zu Well unter Angabe des Mittelwertes der Ergebnisse pro Versuch, deren Standardabweichung, Variationskoeffizient und Anzahl der Ergebnisse pro Tag**



### 5.3 Buprenorphine

In Abbildung 29 werden die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Versuche unter Normalbedingungen dargestellt. Die daraus resultierenden Variationskoeffizienten spiegeln die Schwankungen innerhalb der Testergebnisse wieder. Nur zwei Werte liegen unter 25%. Die maximale Schwankung erreicht der 1 ng/ml-Kalibrator mit einem Variationskoeffizienten von 30,02%.

Konzentration in ng/ml	n	MW	S	cv
0	6	1,79	0,43	24,01
0,5	6	0,56	0,12	21,21
1	5	0,32	0,10	30,02
5	5	0,12	0,03	22,70

**Abbildung 29: Inter-Assay-Präzision der Buprenorphin-EIAs unter Angabe der Mittelwerte, Standardabweichungen und daraus resultierenden Variationskoeffizienten aller generierten Ergebnisse unter Normalbedingungen**

## 5.3 Buprenorphine

### 5.3.1 Differenzierbarkeit der Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Mittelwerte und der Standardverteilungen in Abbildung 30 wird deutlich, dass sich keine der angegebenen Intervalle der Buprenorphin-Mikrotiterplatten überschneiden.

Konzentration	MW	S	MW-S	MW+S
0 ng/ml	1,79	0,43	1,36	2,22
0,5 ng/ml	0,56	0,12	0,44	0,68
1 ng/ml	0,32	0,10	0,22	0,42
5 ng/ml	0,12	0,03	0,09	0,15

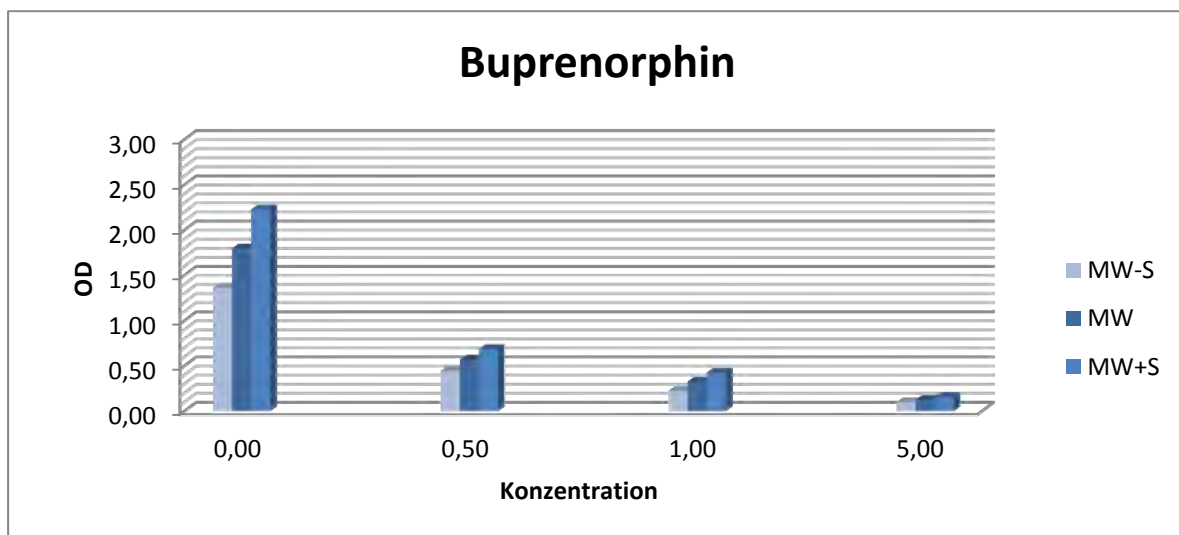


Abbildung 30: Differenzierbarkeit der Ergebnisse von BUP-EIAs unter Angabe der Mittelwerte und der  $1\sigma$ -Intervalle

## 5.3 Buprenorphine

### 5.3.2 Einfluss der Inkubationszeit, Umgebungstemperatur und des Waschpuffers

Bei den vorangegangenen Betrachtungen anderer Drogen-EIAs sanken die Variationskoeffizienten der Triplikate deutlich. Am Beispiel der Buprenorphin-Mikroplatten zeigt sich, dass eine Steigerung der optischen Dichten nicht direkt mit der Nutzung von Waschpufferlösungen zusammenhängt, wie in Abbildung 31 sichtbar ist. Es existiert keine merkliche Veränderung der Werte nach Einsatz des Waschpuffers während einige Testreihen sogar im Vergleich niedrigere Werte aufwiesen als solche, die nur mit destilliertem Wasser gewaschen wurden. Die verwendeten Platten wiesen durchgängig in allen Versuchen vergleichsweise niedrige Well-zu-Well-Variationskoeffizienten auf. Es konnte daher keine Verbesserung der Schwankungen durch die Nutzung von Waschpuffern verzeichnet werden.

Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0,0	1,09	1,53	1,01	8,58
0,5	0,37	6,48	0,36	9,97
1,0	0,24	5,78	0,23	3,52
5,0	0,12	2,16	0,12	5,21
	Mit Waschpuffer		Bei 22°C Raumtemperatur	

**Abbildung 31: Vergleich von Versuchen mit Benzodiazepin-EIAs mit und ohne Waschpuffer unter Angabe der Mittelwerte der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuch und den daraus entstehenden Variationskoeffizienten**

### 5.3 Buprenorphine

Die Buprenorphin-Mikrotiterplatten verhalten sich instabil gegenüber Veränderungen der Raumtemperatur. In einem Vergleichstestlauf konnte eine Abweichung von über 1,0 der Nullkalibratoren zueinander registriert werden, wie in Abbildung 32 sichtbar wird.

Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0,0	2,21	9,69	0,97	2,32
0,5	0,79	5,03	0,32	6,20
1,0	0,48	11,70	0,19	1,08
5,0	0,18	3,77	0,07	1,49
	Bei 31°C Raumtemperatur		Bei 22°C Raumtemperatur	

**Abbildung 32: Auswirkung der Temperaturänderungen durch Angabe der Mittelwerte der 6 Ergebnisse des jeweiligen Versuchs unter variierenden Testbedingungen, wie der Umgebungstemperatur**

In dem zweiten Versuchsbeispiel diesbezüglich zeigt sich keine deutliche Änderung der Werte, was den Beweis eines Einflusses der Temperatur auf die optischen Dichten erschwert. Es ist ratsam, wie [LUT 09] empfiehlt, die Reagenzien sowie die Platten selbst auf Raumtemperatur zu bringen.

### 5.3 Buprenorphine

In Abbildung 33 ist deutlich eine Erhöhung der optischen Dichten nach 60 Minuten Inkubationszeit vor dem Waschschrift zu sehen. In diesem Versuchsteil wird deutlich, dass eine veränderte Inkubationszeit einen direkten Einfluss auf die Ergebnisse hat, da alle Versuche erhöhte optische Dichten aufweisen. Es ist hiernach notwendig, die Inkubationszeit auf die vorgeschriebenen 30 Minuten zu begrenzen, um deutlich erhöhte Werte zu vermeiden und somit die Gefahr der Nichterfassung von Ergebnissen zu entgehen.

Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0	0,94	2,77	2,44	5,11
0,5	0,31	3,04	0,84	5,46
1	0,18	5,00	0,36	10,57
5	0,07	7,05	0,14	4,04
	30 min Inkubationszeit		60 min Inkubationszeit	

**Abbildung 33: Einfluss der Inkubationszeit auf die ODs unter Darstellung des Mittelwertes der 6 Ergebnisse der Versuche unter Normalbedingung und unter veränderter Bedingung, hier der verlängerten Inkubationszeit**

Insgesamt betrachtet sind die stichprobenhaft verwendeten Mikrotiterplatten zu Detektion von Buprenorphinen um Untersuchungsvolumen als ausreichend robust zu bezeichnen. Veränderungen in der Temperatur verursachen keine eindeutig reproduzierbaren Ergebnisänderungen in Vergleich zu Versuchen unter Normalbedingungen. Lediglich Inkubationszeitverlängerungen konnten reproduzierbare Einflüsse auf die Ods nehmen.

### 5.3 Buprenorphine

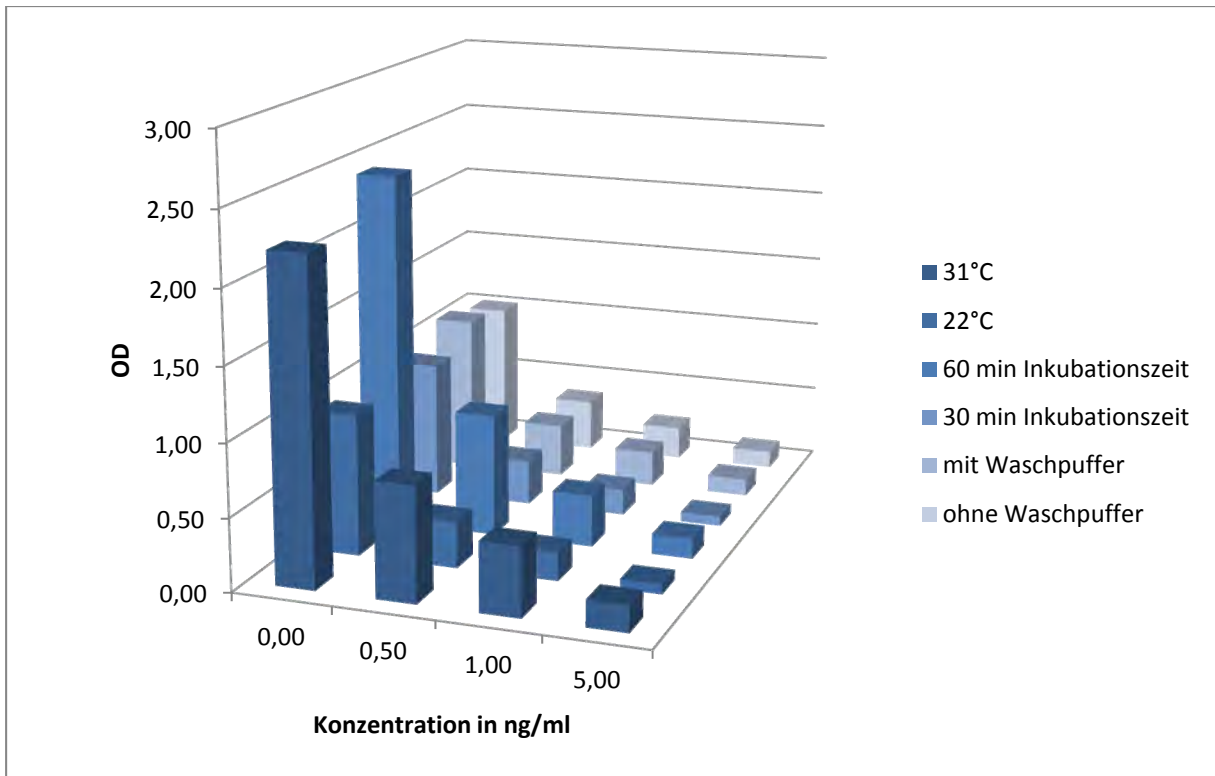


Abbildung 34: Darstellung der optischen Dichten unter verschiedenen Versuchsbedingungen geordnet nach Testbedingungen und Konzentrationslevel

## 5.3 Buprenorphine

### 5.3.4 Bewertung der statistischen Signifikanz

Die errechneten Konfidenzintervalle überschneiden sich in keinem Fall. Die Ergebnisse sind damit als statistisch signifikant zu bezeichnen. Es ist nach Abbildung 35 festzustellen, dass der erwartete Wert der optischen Dichten des Null-Kalibrators mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit zwischen 1,67 und 1,90 liegt.

Konzentration	Konfidenz	Konfidenzintervall MW±Konfidenz	Obergrenze	Untergrenze
0 ng/ml	0,11	1,79±0,11	1,90	1,67
0,5 ng/ml	0,03	0,56±0,03	0,59	0,53
1 ng/ml	0,03	0,32±0,03	0,35	0,29
5 ng/ml	0,01	0,12±0,01	0,13	0,11

Abbildung 35: Konfidenzintervalle der Inspec-BUP-EIAs

### 5.3 Buprenorphine

#### BUP-Enzymimmunoassay

**Kalibratorsubstanz:** Buprenorphin

**Cutoff:** 0,5 ng/ml

**Untere Nachweisgrenze mittels EIA:** 0,25 ng/ml

**Messbereich im EIA:** 0-5 ng/ml

**Pipettierschema der Proben und Kalibratoren in ng/ml eines Versuchs:**

**Testbedingungen laut Hersteller:**

	A	B	C	D
1	0	0	0	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content;">                     Kalibratorsubstanzen zur Erstellung der Kalibrationskurve                       Native Probenvolumina, in diesem Fall Kalibratorsubstanzen                 </div>
2	0,5	0,5	0,5	
3	1	1	1	
4	5	5	5	
5	0	0	0	
6	0,5	0,5	0,5	
7	1	1	1	
8	5	5	5	

- Raumtemperatur ( 22°C)
- Keine Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- 30 Min Inkubationszeit

**Zur Ermittlung der Einflüsse wurden folgende Testbedingungen verändert:**

- Raumtemperatur auf 31°C erhöht
- Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 Min

Konzentration	n	MW	S	cv in %	MW+S	MW-S	Proben in diesem Bereich sind	MW	cv in%	MW	cv in%	MW	cv in %	
0 ng/ml	6	1,79	0,43	24,01	2,22	1,36	Negativ	2,21	9,69	2,44	5,11	1,09	1,53	
0,5 ng/ml	6	0,56	0,12	21,21	0,68	0,44	Cutoff	0,79	5,03	0,84	5,46	0,37	6,48	
1 ng/ml	5	0,32	0,10	30,02	0,42	0,22	Positiv	0,48	11,70	0,36	10,57	0,24	5,78	
5 ng/ml	5	0,12	0,03	22,70	0,15	0,09	Positiv	0,18	3,77	0,14	4,04	0,12	2,16	
		<b>Inter-Assay-Präzision</b>							Beispiel bei 31°C Raumtemperatur		Beispiel Mit 60 Min Inkubationszeit		Beispiel unter Nutzung von Waschpuffer	



### 5.3 Buprenorphine

<b>Intra-Assay-Präzision:</b>	3	<b>Einfluss des Waschpuffers:</b>	→D
<b>Inter-Assay-Präzision:</b>	3	<b>Einfluss der verlängerten Inkubationszeit:</b>	Ca. 29%→ B
<b>Differenzierbarkeit der Ergebnisse:</b>	1	<b>Einfluss der erhöhten Umgebungstemperatur:</b>	→ D
<b>Signifikanz (Konfidenzintervalle):</b>	1		

*Es wird der Mittelwert der jeweiligen Konzentrationslevel eingesetzt und daraus ein Mittelwert gebildet, wenn beide Versuche diesbezüglich eine Veränderung der Werte nach sich zog.*

1-max. cv in % < 20% oder sehr gut

$$\mathbf{A+} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 60\% \text{ (sehr hoher Einfluss)}$$

2- max. cv in % < 30% oder gut

$$\mathbf{A-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 40\% \text{ (hoher Einfluss)}$$

3- max. cv in % ≤ 45% oder befriedigend

$$\mathbf{B-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 20\% \text{ (wenig Einfluss)}$$

4- max. cv in % > 45% oder ausreichend

$$\mathbf{C-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) \leq 20\% \text{ (kaum Einfluss)}$$

5- max. cv in % > 65% oder ungenügend

**D-** nicht eindeutig nachweisbarer Einfluss

## 5.4 Kokain

Für die Ermittlung von Daten wurden 5 Versuche mit Kokain-Mikrotiterplatten durchgeführt. Mit den Plattenchargen EK9666 und BK0108 erfolgten 5 Versuche unter Normalbedingungen. An einem Versuchstag wurde eine 24-fach-Bestimmungen mit dem Negativ-Kalibrator durchgeführt, weshalb die Anzahl der Versuche bezüglich des 0 ng/ml-Kalibrators bei 6 liegt. In den Wertetabellen im elektronischen Anhang sind die einzelnen Ergebnisse dargestellt. Die Versuche wurden hierbei mit Kalibratoren der Konzentrationslevel 0 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml und 300 ng/ml bearbeitet. Auf Seite 60 und 61 ist eine Zusammenfassung der Versuchsgrundlagen und daraus resultierenden Ergebnisse dargestellt. Diese soll einen möglichst schnellen Überblick über die erlangten Erkenntnisse bezüglich COC-EIAs geben.

### 5.4.3 Beurteilung der Intra- und Interassay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision in der Abbildung 36 zeigt, dass die Kokain-Mikrotiterplatten Variationskoeffizienten über 25% erzielen. Die höchste Abweichung ist mit 32,17% zu verzeichnen, während die geringste Abweichung 8,20% beträgt. Der Variationskoeffizient steigt wieder mit sinkender OD.

Datum	0 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml		300 ng/ml		n
	MW±S	cv in %	MW±S	cv in %	MW±S	cv in %	MW±S	cv in %	
15.5.13									
23.5.13	2,05±0,36	17,73	1,04±0,26	24,81	0,34±0,04	12,40	0,12±0,03	28,22	6
11.6.13	2,38±0,33	13,94							24
1.7.13	1,76±0,25	14,33	1,02±0,08	8,29	0,41±0,08	18,62	0,13±0,03	19,25	6
2.7.13	1,81±0,15	8,20	1,11±0,30	27,01	0,38±0,04	11,29	0,12±0,02	12,65	6
25.7.13	2,19±0,22	10,00	1,09±0,10	9,23	0,35±0,03	9,55	0,07±0,01	14,55	6
15.5.13	1,85±0,46	24,95	0,83±0,09	10,77	0,28±0,03	10,01	0,05±0,02	32,17	6

**Abbildung 36: Intra-Assay-Präzision von Well zu Well unter Angabe des Mittelwertes der Ergebnisse pro Versuch, deren Standardabweichung, Variationskoeffizient und Anzahl der Ergebnisse pro Tag**

## 5.4 Kokain

In der Abbildung 37 ist zu sehen, dass die Variationskoeffizienten unter 25% liegen, bis auf den der 300 ng/ml-Kontrolle mit 37,43%. Dies ist als wenig relevant zu betrachten, da eine qualitative Aussage bezüglich des Vorhandenseins der gesuchten Substanz getroffen werden kann. Dem Intended Use nach ist es wichtig, dass eine Unterscheidung zwischen einer positiven und einer negativen Probe möglich ist. Durch die geringen Schwankungen zwischen Null-Kalibrator und erster Positiv-Kontrolle kann eine klare Aussage diesbezüglich getroffen werden.

Konzentration in ng/ml	n	MW	S	cv
0	6	2,13	0,40	18,72
10	5	1,02	0,21	20,13
50	5	0,35	0,06	17,69
300	5	0,10	0,04	37,43

**Abbildung 37: Inter-Assay-Präzision unter Angabe der Anzahl der einfließenden Werte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Ergebnisse der Versuche unter Normalbedingungen**

## 5.4 Kokain

### 5.4.1 Differenzierbarkeit der Ergebnisse

Die Kokain-Mikrotiterplatten zeigten unter Normalbedingungen ausreichend differenzierbare Ergebnisse. In der Tabelle in Abbildung 38 zeigt sich, dass die Differenzierbarkeit der Ergebnisse ausgehend vom Mittelwert in Differenz und Summe mit der einfachen Standardabweichung gegeben ist.

Der Unterschied zwischen der Differenz des Mittelwertes des Nullkalibrators mit der einfachen Standardabweichung und der Summe des Mittelwertes des 10 ng/ml- Kalibrators mit der einfachen Standardabweichung beträgt 0,43.

Konzentration	MW	S	MW-S	MW+S
0 ng/ml	2,13	0,40	1,73	2,53
10 ng/ml	1,09	0,21	0,88	1,30
50 ng/ml	0,35	0,06	0,29	0,41
300 ng/ml	0,10	0,04	0,06	0,14

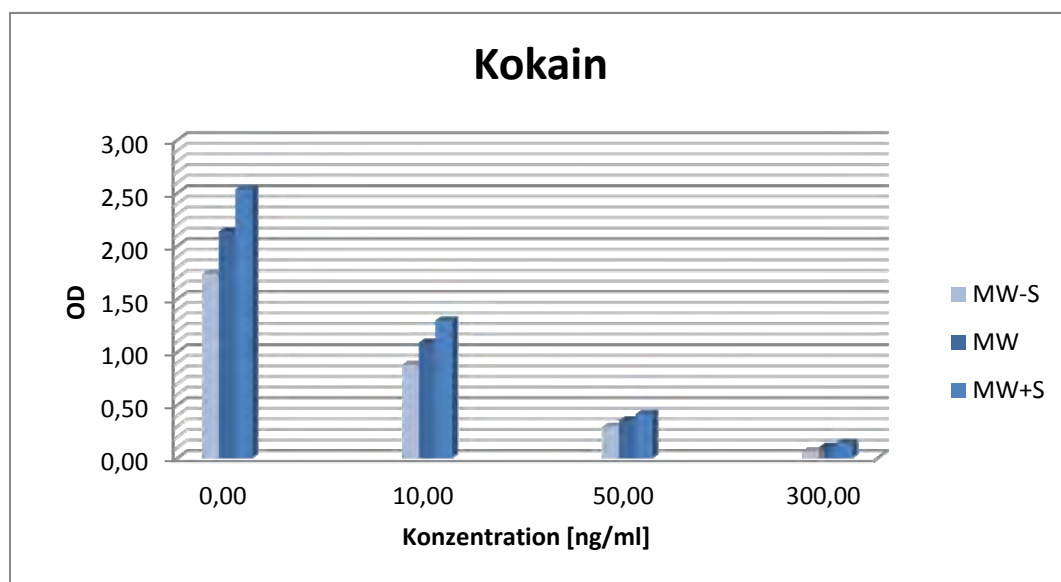


Abbildung 38: Differenzierbarkeit der Ergebnisse ausgehend vom Mittelwert aller Versuche unter Normalbedingungen, sowie deren Standardabweichungen, Variationskoeffizienten anhand einer Darstellung der Werte in einer Tabelle und einem Diagramm zur Visualisierung der Unterschiede zwischen den Intervallen

## 5.4 Kokain

### 5.4.2 Einfluss der Temperatur, Inkubationszeit und des Waschpuffersystems

Die Temperatur als Einflussfaktor auf die optischen Dichten der Kokain-EIAs ist als gering zu bezeichnen. In zwei durchgeführten Versuchen diesbezüglich konnte ein Vergleich lediglich einen Unterschied von 0,38 erzielen während der zweite Vergleich eine höhere optische Dichte unter geringerer Temperatur erbrachte. Hiernach ist die Umgebungstemperatur als nicht eindeutig zu bewerten. In Abbildung 39 ist eine vergleichende Darstellung diesbezüglich sichtbar.

Konzentration in ng/ml	OD	cv in%	OD	cv in%
0	2,46	6,15	2,08	16,61
10	1,37	3,12	0,89	9,21
50	0,51	8,69	0,29	11,36
300	0,15	3,27	0,07	6,88
	31°C Raumtemperatur		22°C Raumtemperatur	

**Abbildung 39: Auswirkung der Temperaturänderungen durch Angabe der Mittelwerte der 6 Ergebnisse des jeweiligen Versuchs**

## 5.4 Kokain

Ebenso die Inkubationszeit hat keinen deutlichen Einfluss auf die Ergebnisse der Kokain-Mikrotiterplatten. In einer Wiederholung des Versuchs konnten keine ähnlichen Veränderungen festgestellt werden, sodass ein eindeutiger Einfluss nicht belegt werden kann.

Konzentration in ng/ml	OD	cv in%	OD	cv in%
0	3,16	1,65	2,23	9,34
10	1,87	2,54	1,09	14,07
50	0,72	3,50	0,37	7,81
300	0,18	2,85	0,08	13,71
	60 min Inkubationszeit		30 min Inkubationszeit	

**Abbildung 40: Einfluss der Inkubationszeit auf die ODs der Kokain-EIAs anhand der exemplarischen Darstellung eines Versuchs unter Normalbedingung und eines mit verlängerter Inkubationszeit**

## 5.4 Kokain

Die Verwendung von Waschpuffer konnte Differenzen von bis zu 1,0 bedingen. Ebenso wurden die cvs unter Verwendung von Waschpuffer gesenkt, was in Abbildung 41 sichtbar wird.

Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0	2,73	2,50	1,71	7,73
10	1,63	3,46	1,03	12,51
50	0,61	1,56	0,37	11,28
300	0,17	8,46	0,13	3,09
	mit Waschpuffer		Ohne Waschpuffer	

Abbildung 41: Darstellung der optischen Dichten der Kokain-EIAs ohne Verwendung und mit Verwendung von Waschpuffer mittels der Angabe der mittleren OD der jeweiligen Versuche und deren cvs

Die Kokain-Mikrotiterplatten sind nach Auswertung der Versuchsergebnisse als robust zu bezeichnen. Die Veränderung der Testbedingungen bewirkt kaum Änderungen in den Ergebnissen, was auch durch Abbildung 42 deutlich wird.

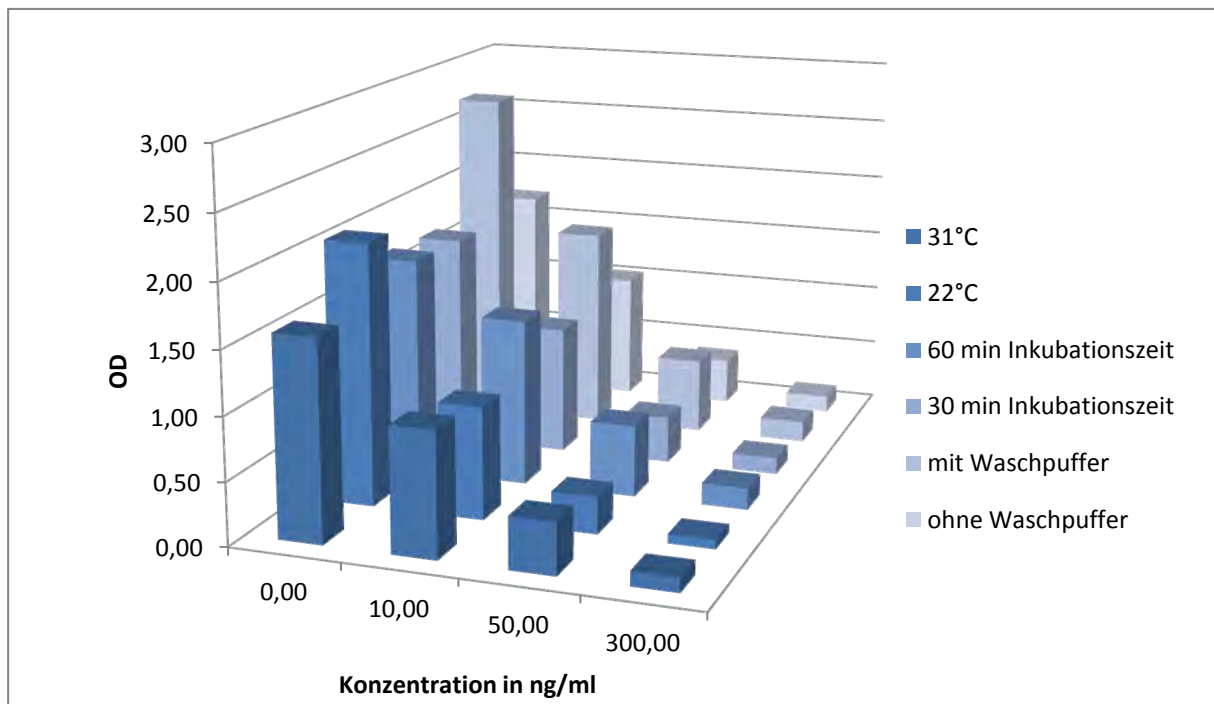


Abbildung 42: Darstellung der optischen Dichten der Kokain-EIAs unter variierenden Testbedingungen geordnet nach den Konzentrationslevels

## 5.4 Kokain

### 5.4.4 Bewertung der statistischen Signifikanz

Anhand der Abbildung 43 wird ersichtlich dass sich die Konfidenzintervalle der Konzentrationslevel der getesteten Kokain-Mikrotiterplatten nicht überschneiden, was zu der Aussage führt, dass die Ergebnisse statistisch signifikant unterschiedlich sind. Somit ist eine klare Differenz zwischen positiven und negativen Ergebnissen ermöglicht.

Konzentration	Konfidenz	Konfidenzintervall MW±Konfidenz	Obergrenze	Untergrenze
0 ng/ml	0,11	2,13±0,11	2,24	2,03
10 ng/ml	0,07	1,02±0,07	1,09	0,95
50 ng/ml	0,02	0,35±0,02	0,37	0,33
300 ng/ml	0,01	0,10±0,01	0,11	0,09

Abbildung 43: 95%-Konfidenzintervalle der Kokain-Mikroplatten



## 5.4 Kokain

### COC-Enzymimmunoassay

**Kalibratorsubstanz:** Benzoyllecgonin

**Cutoff:** 10 ng/ml

**Untere Nachweisgrenze mittels EIA:** 1 ng/ml

**Messbereich im EIA:** 0-300 ng/ml

**Pipettierschema der Proben und Kalibratoren in ng/ml eines Versuchs:**

**Testbedingungen laut Hersteller:**

	A	B	C	D
1	0	0	0	Kalibratorsubstanzen zur Erstellung der Kalibrationskurve
2	10	10	10	
3	50	50	50	
4	300	300	300	
5	0	0	0	Native Probenvolumina, in diesem Fall Kalibratorsubstanzen
6	10	10	10	
7	50	50	50	
8	300	300	300	

- Raumtemperatur ( 22°C)
- Keine Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- 30 Min Inkubationszeit

**Zur Ermittlung der Einflüsse wurden folgende Testbedingungen verändert:**

- Raumtemperatur auf 31°C erhöht
- Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 Min

Konzentration	n	MW	S	cv in %	MW+S	MW-S	Proben in diesem Bereich sind	MW	cv in%	MW	cv in%	MW	cv in %
0 ng/ml	6	2,13	0,40	18,72	2,53	1,73	Negativ	2,46	6,15	3,16	1,65	2,73	2,50
10 ng/ml	5	1,02	0,21	20,13	1,30	0,88	Cutoff	1,37	3,12	1,87	2,54	1,63	3,46
50 ng/ml	5	0,35	0,06	17,69	0,41	0,29	Positiv	0,51	8,69	0,72	3,50	0,61	1,56
300 ng/ml	5	0,10	0,04	37,43	0,14	0,06	Positiv	0,15	3,27	0,18	2,85	0,17	8,46
Inter-Assay-Präzision								Beispiel bei 31°C Raumtemperatur	Beispiel Mit 60 Min Inkubationszeit	Beispiel unter Nutzung von Waschpuffer			

## 5.4 Kokain

<b>Intra-Assay-Präzision:</b>	3	<b>Einfluss des Waschpuffers:</b>	Ca.53% →A
<b>Inter-Assay-Präzision:</b>	3	<b>Einfluss der verlängerten Inkubationszeit:</b>	→ D
<b>Differenzierbarkeit der Ergebnisse:</b>	1	<b>Einfluss der erhöhten Umgebungstemperatur:</b>	→ D
<b>Signifikanz (Konfidenzintervalle):</b>	1		

*Es wird der Mittelwert der jeweiligen Konzentrationslevel eingesetzt und daraus ein Mittelwert gebildet, wenn beide Versuche diesbezüglich eine Veränderung der Werte nach sich zog.*

1-max. cv in % < 20% oder sehr gut

$$\mathbf{A+} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 60\% \text{ (sehr hoher Einfluss)}$$

2- max. cv in % < 30% oder gut

$$\mathbf{A-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 40\% \text{ (hoher Einfluss)}$$

3- max. cv in % ≤ 45% oder befriedigend

$$\mathbf{B-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 20\% \text{ (wenig Einfluss)}$$

4- max. cv in % > 45% oder ausreichend

$$\mathbf{C-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) \leq 20\% \text{ (kaum Einfluss)}$$

5- max. cv in % > 65% oder ungenügend

**D-** nicht eindeutig nachweisbarer Einfluss

## 5.5 Methamphetamine

Für die Ermittlung der Daten zu den Methamphetamine-EIAs wurden 7 Versuche unter Normalbedingungen durchgeführt. Die in die Berechnungen einfließenden Chargen sind BK0076 und EK9663. In den Wertetabellen im elektronischen Anhang sind die einzelnen Ergebnisse dargestellt. Die Versuche wurden hierbei mit Kalibratoren der Konzentrationslevel 0 ng/ml, 25 ng/ml, 100 ng/ml und 500 ng/ml bearbeitet. Auf Seite 69 und 70 ist eine Zusammenfassung der Versuchsgrundlagen und daraus resultierenden Ergebnisse dargestellt. Diese soll einen möglichst schnellen Überblick über die erlangten Erkenntnisse bezüglich MET-EIAs geben.

### 5.5.1 Intra- und Interassay-Präzision

Datum	0 ng/ml		25 ng/ml		100 ng/ml		500 ng/ml		n
	OD±S	cv in %	OD±S	cv in %	OD±S	cv in %	OD±S	cv in %	
2.5.13	2,05±0,27	13,21	0,87±0,08	9,50	0,35±0,01	3,81	0,12±0,00	2,18	6
7.5.13	2,01±0,43	21,35	0,94±0,12	13,31	0,38±0,04	11,93	0,12±0,01	10,66	6
8.5.13	2,69±0,19	7,11	1,31±0,06	4,85	0,47±0,05	10,58	0,15±0,01	4,85	6
16.5.13	2,90±0,23	8,08	1,33±0,11	8,45	0,52±0,06	12,10	0,16±0,02	15,48	6
23.5.13	2,06±0,21	10,07							24
11.6.13					0,62±0,08	12,95			24
1.7.13	2,23±0,10	4,62	1,25±0,10	7,79	0,53±0,05	9,36	0,18±0,01	4,46	6
2.7.13	1,38±0,13	9,68	0,81±0,09	10,75	0,31±0,04	12,45	0,08±0,02	32,31	6
25.7.13	2,93±0,10	3,52	1,35±0,04	3,07	0,48±0,02	3,64	0,15±0,01	3,71	6

**Abbildung 44: Darstellung der Variationskoeffizienten, optischen Dichten und deren Standardabweichungen von Well zu Well pro Tag der 6 Ergebnisse der jeweiligen Versuche unter Normalbedingungen**

## 5.5 Methamphetamine

Die Intra-Assay-Präzision der Methamphetamine-EIAs zeigt sich in Abbildung 44. Keiner der Variationskoeffizienten ist größer als 20 % bis auf einen mit 32,31% bei dem letzten Positiv-Kalibrator. Die Variationskoeffizienten zeigen, dass die Methamphetamine-Mikroplatten eindeutige Ergebnisse liefern.

In Abbildung 45 ist zu sehen, dass die Variationskoeffizienten der Versuche unter Normalbedingungen kleiner als 25% sind. Damit sind die Inspec-MET-EIAs sehr präzise und liefern reproduzierbare Ergebnisse.

Konzentration	n	MW	S	cv
0 ng/ml	8	2,22	0,48	21,82
25 ng/ml	7	1,12	0,24	21,30
100 ng/ml	8	0,50	0,09	17,92
500 ng/ml	7	0,14	0,03	21,36

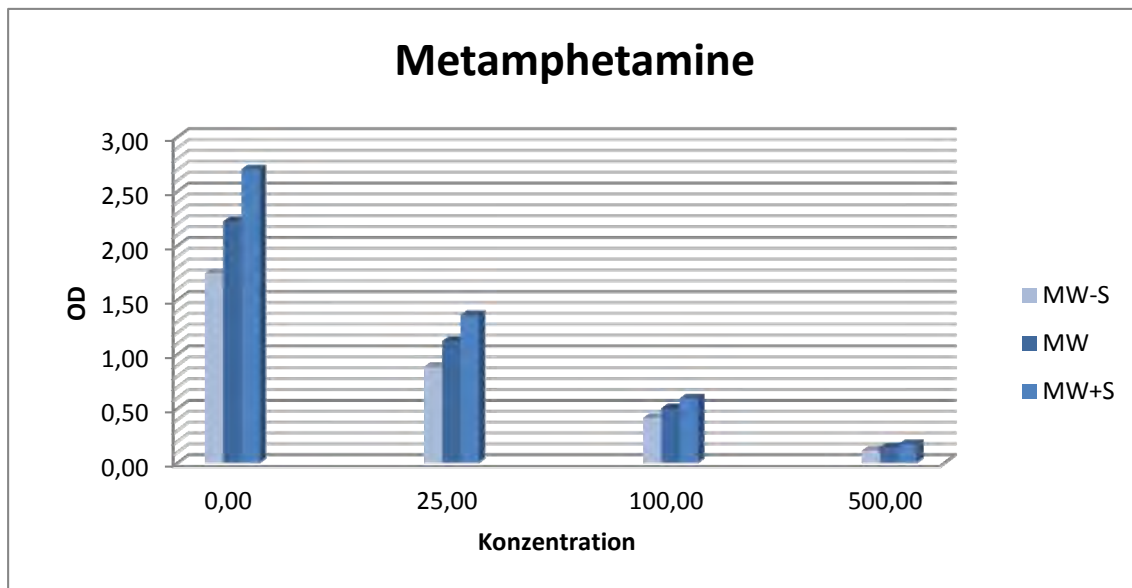
**Abbildung 45: Inter-Assay-Präzision der Methamphetamine-Platten dargestellt durch den Mittelwert aller Ergebnisse, die unter Normalbedingungen generiert wurden, deren Standardabweichungen, den sich daraus ergebenden Variationskoeffizienten und die Anzahl der einfließenden Versuche**

## 5.5 Methamphetamine

### 5.5.2 Differenzierbarkeit der Ergebnisse

In Abbildung 46 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die 95%-Verteilung der Ergebnisse der Versuche unter Normalbedingungen ersichtlich. Anhand dieser Darstellung wird deutlich, dass sich die Intervalle nicht überschneiden, was von einer guten Differenzierbarkeit der Ergebnisse ausgehen lässt.

Konzentration	MW	S	MW-S	MW+S
0 ng/ml	2,22	0,48	1,74	2,70
25 ng/ml	1,12	0,24	0,88	1,36
100 ng/ml	0,50	0,09	0,41	0,59
500 ng/ml	0,14	0,03	0,11	0,17



**Abbildung 46:** Differenzierbarkeit der Ergebnisse der Methamphetamine-Mikroplatten dargestellt anhand einer Wertetabelle mit den Mittelwerten, Standardabweichungen und deren 1s-Intervallen der Ergebnisse aller Versuche unter Normalbedingungen sowie eines Diagramms dieser Werte zur Visualisierung der Differenzierbarkeit

## 5.5 Methamphetamine

### 5.5.3 Der Einfluss von Temperatur, Waschpuffer und Inkubationszeit

In zwei vergleichenden Versuchsdurchgängen wurde der Einfluss der Temperatur auf die Methamphetamine-Mikrotiterplatten untersucht. In Abbildung 47 wird exemplarisch einer dieser Durchläufe anhand einer Gegenüberstellung eines Versuchs unter Normalbedingungen mit einem unter erhöhter Raumtemperatur von 31°C tabellarisch dargestellt.

Konzentration	OD	cv	OD	cv
0 ng/ml	2,12	4,53	1,43	11,69
25 ng/ml	1,26	3,32	0,87	11,178
100 ng/ml	0,50	9,023	0,33	14,35
500 ng/ml	0,17	1,78	0,09	12,56
	31°C Raumtemperatur		22°C Raumtemperatur	

**Abbildung 47: Vergleich von Versuchen unter verschiedenen Umgebungstemperaturen durch das Aufzeigen der mittleren ODs und Variationskoeffizienten der jeweiligen Versuche**

Der große Unterschied zwischen den Ergebnissen ist in diesem Beispiel eindeutig ersichtlich. In dem zweiten Versuchsdurchgang waren jedoch höhere Werte des Versuchs unter 22°C Raumtemperatur im Vergleich zu verzeichnen. Es ist somit nicht nachgewiesen, dass eine Veränderung der Umgebungstemperatur einen direkten Einfluss auf die optischen Dichten der Methamphetamine-EIAs hat.

## 5.5 Methamphetamine

Konzentration	OD	cv	OD	cv
0 ng/ml	3,01	2,35	1,43	11,69
25 ng/ml	1,42	2,70	0,87	11,18
100 ng/ml	0,54	12,24	0,33	14,35
500 ng/ml	0,20	1,61	0,09	12,56
	Mit Waschpuffer		Ohne Waschpuffer	

**Abbildung 48: Vergleichende Versuche zur Detektion des Einflusses von Waschpuffer auf die optischen Dichten der Methamphetamine-Mikroplatten**

Unter Verwendung von Waschpuffer in der Waschlösung konnte eine eindeutige Erhöhung der Werte festgestellt werden. Wie auch bei den anderen Mikroplatten wurde hier ebenfalls eine Verringerung der Variationskoeffizienten von Well zu Well festgestellt. In Abbildung 48 ist eine vergleichende Darstellung ersichtlich.

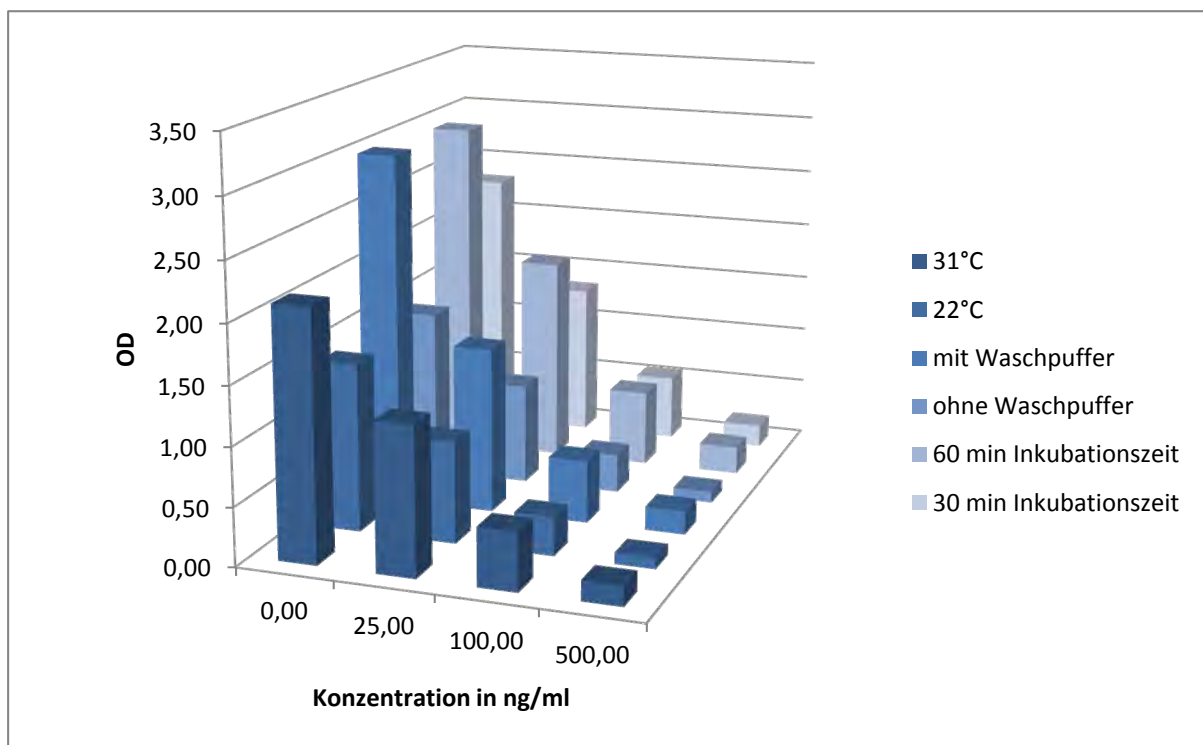
Der Einfluss des Waschpuffers auf die Ergebnisse der Methamphetamine-Mikroplatten ist als eindeutig zu bezeichnen, denn beispielsweise die OD des Null-Kalibrators wird unter Verwendung von einer Waschpufferlösung verdoppelt. Durch die Erhöhung der Werte kann es zur Nichterfassung einiger Ergebnisse kommen.

## 5.5 Methamphetamine

Die Verlängerung der Inkubationszeit von 30 auf 60 Minuten hat bei den Methamphetamine-EIAs eine deutliche Erhöhung der optischen Dichten verursacht. In Abbildung 49 wird deutlich, welchen Einfluss die Variation der Inkubationszeit auf die Ergebnisse hat. Hiernach ist es notwendig die vom Hersteller vorgegebenen 30 Minuten Inkubationszeit einzuhalten um erhöhte Werte, welche außerhalb des Messbereichs liegen, zu vermeiden.

Konzentration	OD	cv	OD	cv
0 ng/ml	2,94	4,50	2,31	2,73
25 ng/ml	1,77	1,94	1,33	4,95
100 ng/ml	0,65	4,51	0,56	8,96
500 ng/ml	0,24	5,49	0,20	4,51
	60 min Inkubationszeit		30 min Inkubationszeit	

**Abbildung 49: Einfluss der Inkubationszeit auf die optischen Dichten der Methamphetamine-EIAs dargestellt durch die Angabe der mittleren ODs und Variationskoeffizienten der jeweiligen Versuche**



**Abbildung 50: Einflüsse verschiedener Testbedingungen auf die Ergebnisse der Methamphetamine-EIAs**



## 5.5 Methamphetamine

### 5.5.4 Bewertung der statistischen Signifikanz

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse der Methamphetamine-Mikrotiterplatten ist in Abbildung 51 ersichtlich. Die Konfidenzintervalle der Konzentrationslevels überschneiden sich in keinem Falle. Der Unterschied zwischen den einzelnen Intervallen ist deutlich, was eine sehr gute statistische Signifikanz der Werte begründet.

Konzentration	Konfidenz	Konfidenz-Intervall MW± Konfidenz	Obergrenze	Untergrenze
0 ng/ml	0,12	2,22±0,12	2,46	1,99
25 ng/ml	0,07	1,12±0,07	1,27	0,98
100 ng/ml	0,02	0,50±0,02	0,55	0,46
500 ng/ml	0,01	0,14±0,01	0,16	0,12

Abbildung 51: Konfidenzintervalle der Methamphetamine-EIAs unter Normalbedingungen

## 5.5 Methamphetamine

### MET-Enzymimmunoassay

**Kalibratorsubstanz:** D-Methamphetamin

**Cutoff:** 25 ng/ml

**Untere Nachweisgrenze mittels EIA:** 5 ng/ml

**Messbereich im EIA:** 0-500 ng/ml

**Pipettierschema der Proben und Kalibratoren in ng/ml eines Versuchs:**

**Testbedingungen laut Hersteller:**

	A	B	C	D
1	0	0	0	
2	25	25	25	
3	100	100	100	
4	500	500	500	
5	0	0	0	
6	25	25	25	
7	100	100	100	
8	500	500	500	

Kalibratorsubstanzen zur Erstellung der Kalibrationskurve

Native Probenvolumina, in diesem Fall Kalibratorsubstanzen

- Raumtemperatur ( 22°C)
- Keine Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- 30 Min Inkubationszeit

**Zur Ermittlung der Einflüsse wurden folgende Testbedingungen verändert:**

- Raumtemperatur auf 31°C erhöht
- Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 Min

Konzentration	n	MW	S	cv in %	MW+S	MW-S	Proben in diesem Bereich sind	MW	cv in%	MW	cv in%	MW	cv in %
0 ng/ml	8	2,22	0,48	21,82	2,70	1,74	Negativ	2,12	4,53	2,94	4,50	3,01	2,35
25 ng/ml	7	1,12	0,24	21,30	1,36	0,88	Cutoff	1,26	3,32	1,77	1,94	1,42	2,70
100 ng/ml	8	0,50	0,09	17,92	0,59	0,41	Positiv	0,50	9,023	0,65	4,51	0,54	12,24
500 ng/ml	7	0,14	0,03	21,36	0,17	0,11	Positiv	0,17	1,78	0,24	5,49	0,20	1,61
Inter-Assay-Präzision								Beispiel bei 31°C Raumtemperatur	Beispiel Mit 60 Min Inkubationszeit	Beispiel unter Nutzung von Waschpuffer			

## 5.5 Methamphetamine

<b>Intra-Assay-Präzision:</b>	3	<b>Einfluss des Waschpuffers:</b>	Ca.28% →B
<b>Inter-Assay-Präzision:</b>	2	<b>Einfluss der verlängerten Inkubationszeit:</b>	Ca.47% →A
<b>Differenzierbarkeit der Ergebnisse:</b>	1	<b>Einfluss der erhöhten Umgebungstemperatur:</b>	→ D
<b>Signifikanz (Konfidenzintervalle):</b>	1		

*Es wird der Mittelwert der jeweiligen Konzentrationslevel eingesetzt und daraus ein Mittelwert gebildet, wenn beide Versuche diesbezüglich eine Veränderung der Werte nach sich zog.*

1-max. cv in % < 20% oder sehr gut

$$\mathbf{A+} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 60\% \text{ (sehr hoher Einfluss)}$$

2- max. cv in % < 30% oder gut

$$\mathbf{A-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 40\% \text{ (hoher Einfluss)}$$

3- max. cv in % ≤ 45% oder befriedigend

$$\mathbf{B-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 20\% \text{ (wenig Einfluss)}$$

4- max. cv in % > 45% oder ausreichend

$$\mathbf{C-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) \leq 20\% \text{ (kaum Einfluss)}$$

5- max. cv in % > 65% oder ungenügend

**D-** nicht eindeutig nachweisbarer Einfluss

## 5.6 Methadon

Für die Ermittlung der Daten zu den Methadon-EIAs wurden 4 Versuche unter Normalbedingungen durchgeführt. Die in die Berechnungen einfließenden Chargen sind BK107 und EK9667. In den Wertetabellen im elektronischen Anhang sind die einzelnen Ergebnisse dargestellt. Die Versuche wurden hierbei mit Kalibratoren der Konzentrationslevel 0 ng/ml, 5 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml bearbeitet. Auf Seite 78 und 79 ist eine Zusammenfassung der Versuchsgrundlagen und daraus resultierenden Ergebnisse dargestellt. Diese soll einen möglichst schnellen Überblick über die erlangten Erkenntnisse bezüglich MTD-EIAs geben.

### 5.6.1 Intra- und Interassay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision der Methadon-EIAs zeigt sich in Abbildung 52. Keiner der Variationskoeffizienten ist größer als 25 %, bis auf den des 100 ng/ml-Kalibrators am 25.7.2013. Die Variationskoeffizienten zeigen, dass die Methadon-EIAs ausreichend präzise Ergebnisse liefern und die cvs steigen mit sinkender OD.

Datum	0 ng/ml		5 ng/ml		25 ng/ml		100 ng/ml		n
	OD±S	cv in %	OD±S	cv in %	OD±S	cv in %	OD±S	cv in %	
23.05.13	2,41±0,13	5,24							24
01.07.13	2,39±0,08	3,18	1,57±0,09	5,82	0,67±0,05	6,73	0,09±0,02	16,48	6
02.07.13	2,27±0,17	7,32	1,37±0,22	16,12	0,55±0,10	18,31	0,06±0,01	18,77	6
25.07.13	1,99±0,15	7,40	0,56±0,06	11,02	0,07±0,01	21,36	0,03±0,01	48,36	6

**Abbildung 52: Darstellung der Variationskoeffizienten, mittleren ODs und deren Standardabweichungen von Well zu Well pro Tag der Methadon-EIAs unter Normalbedingungen**

## 5.6 Methadon

In Abbildung 53 ist zu sehen, dass die Variationskoeffizienten der Versuche unter Normalbedingungen größer als 50% sind. Die Abweichung des 25 ng/ml-Kalibrators ist größer als 60%, was die Gefahr der falschen Bewertung der Ergebnisse deutlich erhöht. Die Inter-Assay-Präzision ist somit als ausreichend zu bewerten. Die hohen Abweichungen kommen durch die geringe Anzahl der Ergebnisse zustande. Da jedoch bei jedem Versuchsdurchlauf im Labor eine Kalibration durchgeführt wird, können die Ergebnisse richtig interpretiert und zugeordnet werden.

Konzentration	n	MW	S	cv
0 ng/ml	4	2,33	0,19	8,33
5 ng/ml	3	1,17	0,47	40,17
25 ng/ml	3	0,43	0,27	63,64
100 ng/ml	3	0,06	0,03	51,12

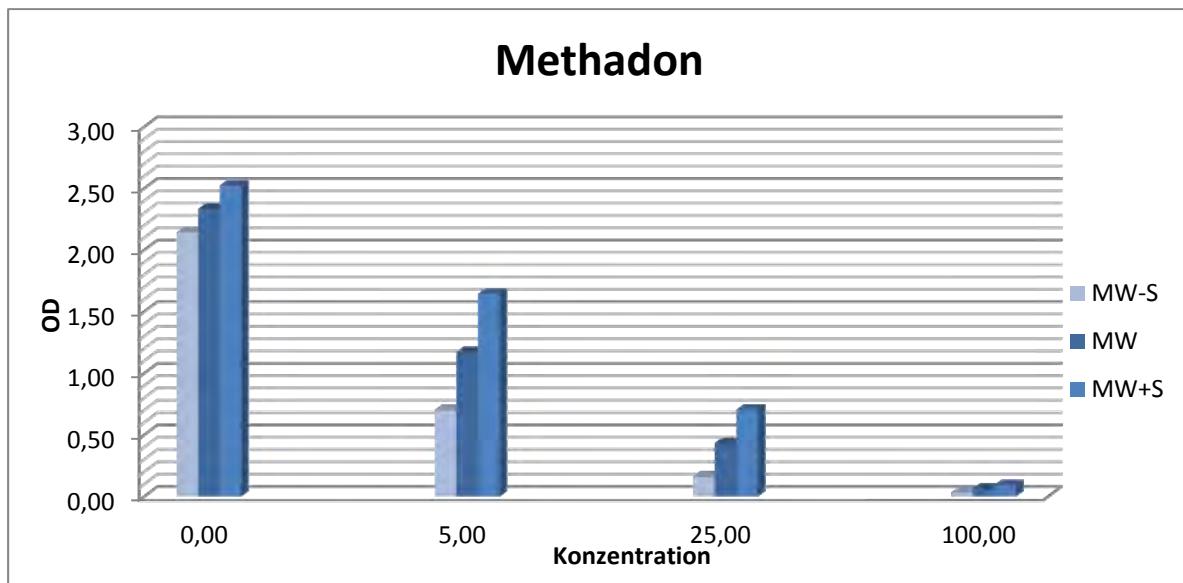
**Abbildung 53: Inter-Assay-Präzision der MTD-EIAs unter Angabe des Mittelwertes, der Standardabweichung und des daraus folgenden Variationskoeffizienten aller generierten Ergebnisse pro Konzentrationslevel unter Normalbedingungen**

## 5.6 Methadon

### 5.6.2 Differenzierbarkeit der Ergebnisse

In Abbildung 54 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die Verteilung der Ergebnisse der Versuche unter Normalbedingungen ersichtlich. Anhand dieser Darstellung wird deutlich, dass sich die Intervalle nicht überschneiden, was von einer guten Differenzierbarkeit der Ergebnisse ausgehen lässt. Trotz der hohen Abweichungen, welche in Kapitel 5.6.1 detailliert ersichtlich sind, sind die ersten beiden Kalibratorlevels eindeutig differenzierbar, sodass der Intended Use klar erfüllt wird.

Konzentration	MW	S	MW-S	MW+S
0 ng/ml	2,33	0,19	2,14	2,52
5 ng/ml	1,17	0,47	0,70	1,64
25 ng/ml	0,43	0,27	0,16	0,70
100 ng/ml	0,06	0,03	0,03	0,09



**Abbildung 54:**Die Differenzierbarkeit der Ergebnisse der Methadon-Mikrotiterplatten anhand einer Wertetabelle, welche die Mittelwerte aller optischen Dichten, deren Standardabweichungen und deren 1S-Intervalle beinhaltet sowie ein Diagramm zur Visualisierung der Differenzierbarkeit der Intervalle

## 5.6 Methadon

### 5.6.3 Einfluss der Temperatur, Inkubationszeit und des Waschpuffers

In zwei Versuchsdurchgängen wurde der Einfluss der Temperatur auf die Methadon-EIAs untersucht. In Abbildung 55 wird exemplarisch einer dieser Durchläufe anhand einer Gegenüberstellung eines Versuchs unter Normalbedingungen mit einem unter erhöhter Raumtemperatur von 31°C tabellarisch dargestellt.

Konzentration	OD	cv	OD	cv
0 ng/ml	3,15	2,98	1,94	5,28
5 ng/ml	2,05	1,92	0,56	6,22
25 ng/ml	1,03	13,05	0,07	22,63
100 ng/ml	0,12	9,86	0,03	47,70
	31°C Raumtemperatur		22°C Raumtemperatur	

**Abbildung 55: Vergleich von Versuchen unter verschiedenen Umgebungstemperaturen mittels einer Wertetabelle unter Angabe der mittleren OD und den Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse des jeweiligen Versuchs**

Der große Unterschied zwischen den Ergebnissen ist in diesem Beispiel eindeutig ersichtlich. Der zweite Versuch dieser Art hatte jedoch ein Sinken der optischen Dichten nach Erhöhung der Raumtemperatur im Vergleich zur Folge. Es ist anhand der Datenanalyse nicht erwiesen, dass die Raumtemperatur einen eindeutigen Einfluss auf die Höhe der optischen Dichten hat.

## 5.6 Methadon

Unter Verwendung von Waschpuffer in der Waschlösung konnte eine eindeutige Erhöhung der Werte festgestellt werden. Wie auch bei den anderen Mikroplatten wurde hier ebenfalls eine Verringerung der Variationskoeffizienten von Well zu Well festgestellt. In Abbildung 56 ist eine vergleichende Darstellung ersichtlich.

Konzentration	OD	cv	OD	cv
0 ng/ml	3,15	0,99	2,01	4,58
5 ng/ml	2,03	0,70	0,47	10,16
25 ng/ml	0,88	6,71	0,06	18,45
100 ng/ml	0,11	9,06	0,05	8,90
	Mit Waschpuffer		Ohne Waschpuffer	

**Abbildung 56: Vergleichende Versuche zur Detektion des Einflusses von Waschpuffer auf die optischen Dichten der Methadon-Mikrotiterplatten unter Angabe der mittleren optischen Dichte sowie Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse pro Konzentrationslevel des jeweiligen Versuchs**

Der Einfluss des Waschpuffers auf die Ergebnisse der Methadon-Mikroplatten ist als sehr hoch zu bezeichnen. Die optischen Dichten steigen beispielsweise im Fall des 5 ng/ml-Kalibrators um das 4-fache an. Die Verwendung von Waschpuffer in der Waschlösung ist, trotz der möglichen Nichterfassung von Werten durch die Messbereichsgrenzen, als positiv für den Intended Use zu bewerten.



## 5.6 Methadon

Die Verlängerung der Inkubationszeit von 30 auf 60 Minuten hat bei den Methadon-EIAs eine deutliche Erhöhung der optischen Dichten verursacht. In Abbildung 57 wird deutlich, welchen Einfluss die Variation der Inkubationszeit auf die Ergebnisse hat. Die Verlängerung der Inkubationszeit erhöht die Möglichkeit der Nichterfassung von Ergebnissen durch die Messbereichsgrenzen. Da jedoch in jedem Versuch eine Kalibration durchgeführt wird, anhand derer die Bestimmung erfolgt, ist die Gefahr der Fehlinterpretation von Ergebnissen gering.

Konzentration	OD	cv	OD	cv
0 ng/ml	3,49	2,84	2,37	4,49
5 ng/ml	2,31	2,00	1,53	7,66
25 ng/ml	0,97	6,50	0,68	8,30
100 ng/ml	0,10	11,58	0,08	6,63
	60 min Inkubationszeit		30 min Inkubationszeit	

Abbildung 57: Der Einfluss der Inkubationszeit auf die optischen Dichten der Methadon-EIAs wird hier anhand der mittleren OD sowie den Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse pro Kalibrator des jeweiligen Versuchs dargestellt

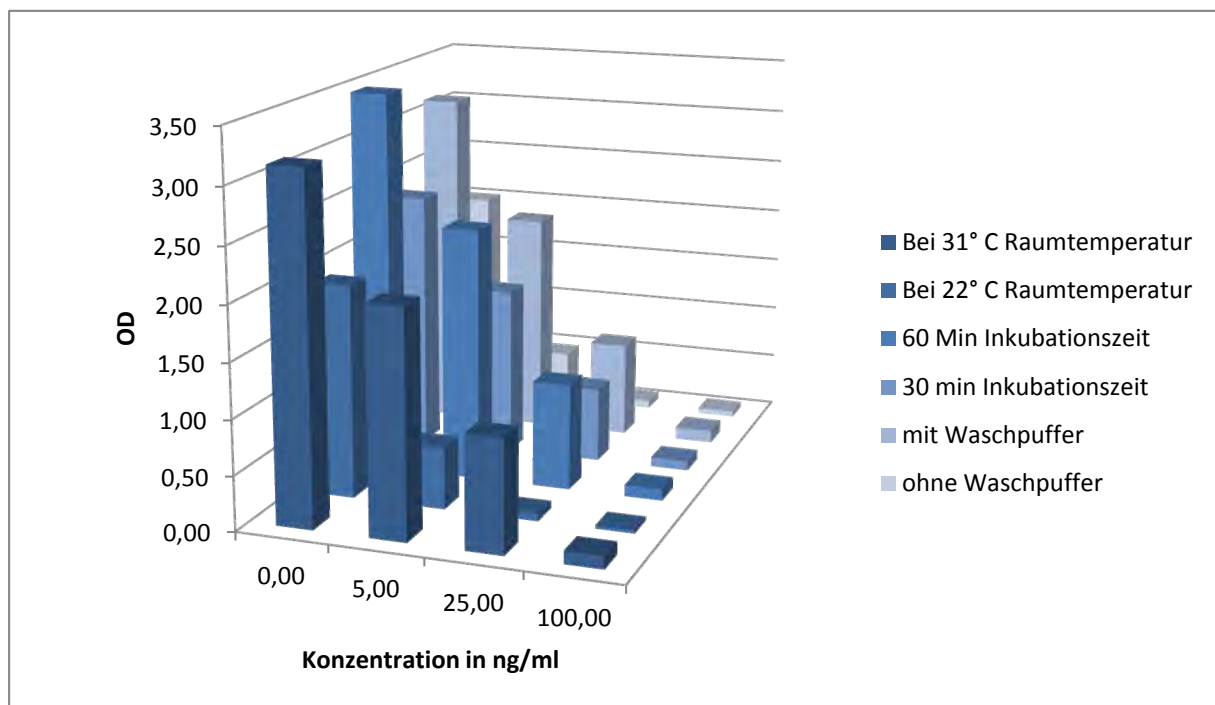


Abbildung 58: Darstellung der Einflüsse verschiedener Testparametervariationen auf die Methadon-EIAs, geordnet nach den Kalibratorlevels und den jeweiligen Versuchsbedingungen

## 5.6 Methadon

### 5.6.4 Bewertung der statistischen Signifikanz

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse der Methadon-Mikrotiterplatten ist in Abbildung 59 ersichtlich. Die Konfidenzintervalle der Konzentrationslevels überschneiden sich in keinem Fall. Der Unterschied zwischen den einzelnen Intervallen ist deutlich, was eine sehr gute statistische Signifikanz der Werte begründet.

Konzentration	Konfidenz	Konfidenz-Intervall MW±Konfidenz	Obergrenze	Untergrenze
0 ng/ml	0,06	2,33±0,06	2,38	2,27
5 ng/ml	0,22	1,17±0,22	1,38	0,95
25 ng/ml	0,13	0,43±0,13	0,56	0,30
100 ng/ml	0,01	0,06±2*0,01	0,07	0,04

Abbildung 59: Konfidenzintervalle der Methadon-EIAs unter Normalbedingungen

## 5.6 Methadon

### MTD-Enzymimmunoassay

**Kalibratorsubstanz:** D-Methadon    **Cutoff:** 5 ng/ml    **Untere Nachweisgrenze mittels EIA:** 1 ng/ml    **Messbereich im EIA:** 0-100 ng/ml

**Pipettierschema der Proben und Kalibratoren in ng/ml eines Versuchs:**

**Testbedingungen laut Hersteller:**

	A	B	C	D
1	0	0	0	
2	5	5	5	
3	25	25	25	
4	100	100	100	
5	0	0	0	
6	5	5	5	
7	25	25	25	
8	100	100	100	

Kalibratorsubstanzen zur Erstellung der Kalibrationskurve

Native Probenvolumina, in diesem Fall Kalibratorsubstanzen

- Raumtemperatur ( 22°C)
- Keine Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- 30 Min Inkubationszeit

**Zur Ermittlung der Einflüsse wurden folgende Testbedingungen verändert:**

- Raumtemperatur auf 31°C erhöht
- Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 Min

Konzentration	n	MW	S	cv in %	MW+S	MW-S	Proben in diesem Bereich sind	MW	cv in%	MW	cv in%	MW	cv in %
0 ng/ml	4	2,33	0,19	8,33	2,52	2,14	Negativ	3,15	2,98	3,49	2,84	3,15	0,99
5 ng/ml	3	1,17	0,47	40,17	1,64	0,70	Cutoff	2,05	1,92	2,31	2,00	2,03	0,70
25 ng/ml	3	0,43	0,27	63,64	0,70	0,16	Positiv	1,03	13,05	0,98	6,50	0,88	6,71
100 ng/ml	3	0,06	0,03	51,12	0,09	0,03	Positiv	0,12	9,86	0,10	11,58	0,11	9,06
Inter-Assay-Präzision								Beispiel bei 31°C Raumtemperatur		Beispiel Mit 60 Min Inkubationszeit		Beispiel unter Nutzung von Waschpuffer	

## 5.6 Methadon

<b>Intra-Assay-Präzision:</b>	4	<b>Einfluss des Waschpuffers:</b>	Ca. 75% → A+
<b>Inter-Assay-Präzision:</b>	4	<b>Einfluss der verlängerten Inkubationszeit:</b>	Ca. 84% → A+
<b>Differenzierbarkeit der Ergebnisse:</b>	2	<b>Einfluss der erhöhten Umgebungstemperatur:</b>	→ D
<b>Signifikanz (Konfidenzintervalle):</b>	1		

*Es wird der Mittelwert der jeweiligen Konzentrationslevel eingesetzt und daraus ein Mittelwert gebildet, wenn beide Versuche diesbezüglich eine Veränderung der Werte nach sich zog.*

1-max. cv in % < 20% oder sehr gut

$$\mathbf{A+} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 60\% \text{ (sehr hoher Einfluss)}$$

2- max. cv in % < 30% oder gut

$$\mathbf{A-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 40\% \text{ (hoher Einfluss)}$$

3- max. cv in % ≤ 45% oder befriedigend

$$\mathbf{B-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 20\% \text{ (wenig Einfluss)}$$

4- max. cv in % > 45% oder ausreichend

$$\mathbf{C-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) \leq 20\% \text{ (kaum Einfluss)}$$

5- max. cv in % > 65% oder ungenügend

**D-** nicht eindeutig nachweisbarer Einfluss

## 5.7 Cannabinoide

Für die Ermittlung von verwertbaren Daten wurden 6 Versuche mit THC-Mikrotiterplatten durchgeführt. Mit den Plattenchargen EK9665 und BK0075 erfolgten 5-6 Durchgänge unter Normalbedingungen. In den Wertetabellen im elektronischen Anhang sind die einzelnen Ergebnisse dargestellt. Die Versuche wurden hierbei mit Kalibratoren der Konzentrationslevel 0 ng/ml, 2 ng/ml, 10 ng/ml und 50 ng/ml bearbeitet. Auf Seite 88 und 89 ist eine Zusammenfassung der Versuchsgrundlagen und daraus resultierenden Ergebnisse dargestellt. Diese soll einen möglichst schnellen Überblick über die erlangten Erkenntnisse bezüglich THC-EIAs geben.

### 5.7.1 Intra- und Interassay-Präzision

Datum	0 ng/ml		2 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml		n
	MW±S	cv in %	MW±S	cv in %	MW±S	cv in %	MW±S	cv in %	
2.5.13	2,32±0,29	12,38	1,13±0,08	7,25	0,16±0,01	3,98	0,04±0,00	8,33	6
8.5.13	1,88±0,11	6,05	0,61±0,12	19,43	0,10±0,01	13,4	0,03±0,00	9,61	6
8.5.13 (1)	1,52±0,28	18,46							24
8.5.13 (2)	1,66±0,14	8,44							24
16.5.13	2,30±0,18	7,75	1,09±0,07	6,79	0,15±0,01	6,23	0,04±0,01	13,08	6
23.5.13	1,88±0,21	11,02							24
11.6.13							0,03±0,00	9,25	24
25.7.13	1,43±0,11	7,540	1,09±0,16	15,028	0,16±0,03	18,934	0,03±0,01	24,767	6
26.7.13	1,26±0,09	6,80	0,76±0,08	11,10	0,16±0,06	39,45	0,05±0,02	45,23	6

Abbildung 60: Die Intra-Assay-Präzision der THC-EIAs unter Angabe der optischen Dichten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten sowie der Anzahl der einberechneten Vertiefungen.

## 5.7 Cannabinoide

Die Intra-Assay-Präzision in der Abbildung 60 zeigt, dass die Cannabinoid-Mikrotiterplatten Variationskoeffizienten über 45% erzielen. Die höchste Abweichung ist mit 45,23% zu verzeichnen, während die geringste Abweichung 3,98% beträgt. Die Intra-Assay-Präzision ist demnach als befriedigend zu bezeichnen.

In Abbildung 61 ist zu sehen, dass die Variationskoeffizienten der Versuche unter Normalbedingungen kleiner 45% sind. Bis auf den Variationskoeffizienten des 25 ng/ml-Kalibratorlevels sind die Prozentangaben kleiner 35 %. Die Inter-Assay-Präzision ist demnach als befriedigend zu bezeichnen.

Konzentration	n	MW	S	cv
0 ng/ml	6	1,78	0,32	17,81
2 ng/ml	5	0,94	0,39	41,39
10 ng/ml	5	0,14	0,04	25,54
50 ng/ml	6	0,04	0,01	31,40

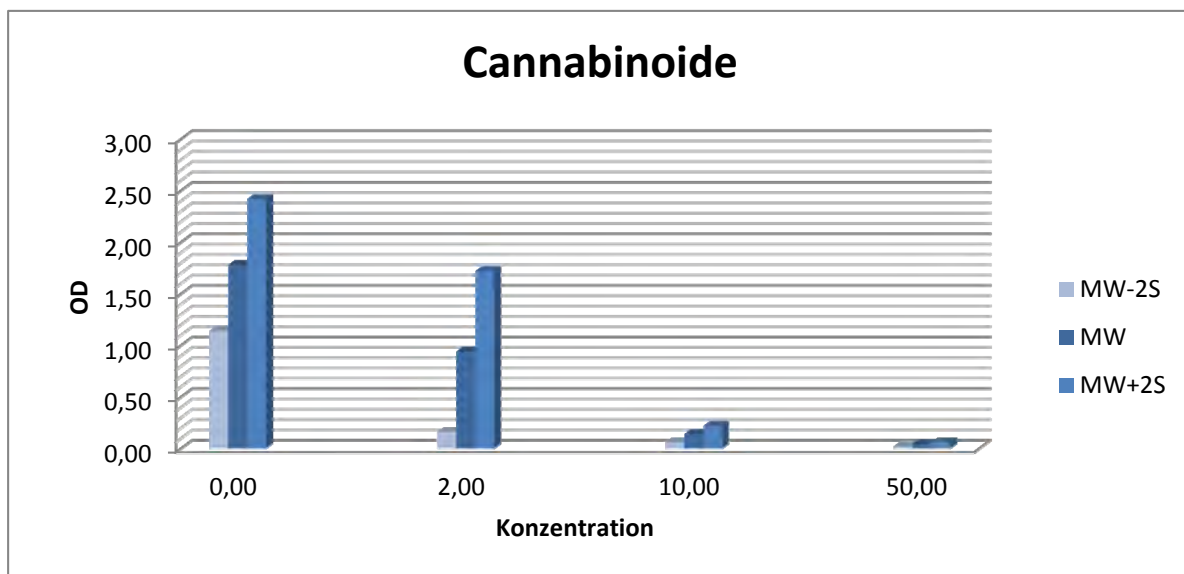
**Abbildung 61: Inter-Assay-Präzision der THC-EIAs unter Angabe der Anzahl der Versuche, Mittelwerte, Standardabweichungen und daraus folgenden Variationskoeffizienten aller Ergebnisse, welche unter Normalbedingungen generiert wurden**

## 5.7 Cannabinoide

### 5.7.3 Die Differenzierbarkeit der Ergebnisse

In Abbildung 62 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die 68%-Verteilung der Ergebnisse der Versuche unter Normalbedingungen ersichtlich. Anhand dieser Darstellung wird deutlich, dass sich die Intervalle überschneiden. Da jedoch bei jedem Versuch eine Kalibration durchgeführt wird, ist der Intended Use weiterhin erfüllt.

Konzentration	MW	S	MW-S	MW+S
0 ng/ml	1,78	0,32	1,14	2,42
2 ng/ml	0,94	0,39	0,16	1,72
10 ng/ml	0,14	0,04	0,06	0,22
50 ng/ml	0,04	0,01	0,02	0,06



**Abbildung 62: Die Differenzierbarkeit der Ergebnisse der THC-Mikrotiterplatten unter Angabe einer Wertetabelle, welche den Mittelwert, die Standardabweichung und die  $1\sigma$ -Intervalle der Ergebnisse unter Normalbedingungen beinhaltet, und eines Diagramms zur Veranschaulichung der Werte**

## 5.7 Cannabinoide

### 5.7.4 Der Einfluss der Temperatur, Inkubationszeit und des Waschpuffers

Die Werte der optischen Dichten steigen der Erwartung nach bei der Verwendung von Waschpuffer. Bei den vorangegangenen Betrachtungen anderer Drogen-EIAs sanken die Variationskoeffizienten der Triplikate deutlich. Am Beispiel der THC-Mikroplatten in Abbildung 63 zeigt sich, dass eine Steigung der optischen Dichten direkt mit der Nutzung von Waschpufferlösungen zusammenhängt. Es konnte ebenfalls Verbesserung der Schwankungen durch die Nutzung von Waschpuffern verzeichnet werden.

Konzentration in ng/ml	MW	cv	MW	cv
0	2,41	2,93	1,53	2,13
2	1,37	3,23	0,81	12,73
10	0,36	9,78	0,11	2,59
50	0,13	8,80	0,03	41,75
	Mit Waschpuffer		Ohne Waschpuffer	

**Abbildung 63: Einfluss der Verwendung von Waschpuffer auf die Abweichungen und optischen Dichten der THC-EIAs unter Angabe der mittleren ODs sowie den Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse pro Kalibrator des jeweiligen Versuchs**



## 5.7 Cannabinoide

Die THC-Mikrotiterplatten verhalten sich instabil gegenüber Veränderungen der Raumtemperatur, wie in Abbildung 64 sichtbar wird. In einem anderen Versuchsbeispiel zeigt sich keine deutliche Änderung der Werte, was den Beweis eines Einflusses der Temperatur auf die optischen Dichten nicht ermöglicht. Demzufolge werden deutliche Abweichungen sowie annähernd gleiche Ergebnisse unter gleichen Testbedingungen in zwei Verläufen zu erhalten. Es ist demnach ratsam, wie [LUT 09] empfiehlt, die Reagenzien sowie die Platten selbst auf Raumtemperatur zu bringen.

Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0	2,22	6,89	1,48	5,88
2	1,73	1,26	1,03	3,90
10	0,37	6,43	0,17	21,61
50	0,10	2,37	0,03	37,37
	Bei 31°C Raumtemperatur		Bei 22°C Raumtemperatur	

**Abbildung 64: Auswirkung der Temperaturänderungen auf die THC-EIAs unter Angabe der mittleren ODs sowie Variationskoeffizienten der 6 Werte pro Kalibrator des jeweiligen Versuchs**

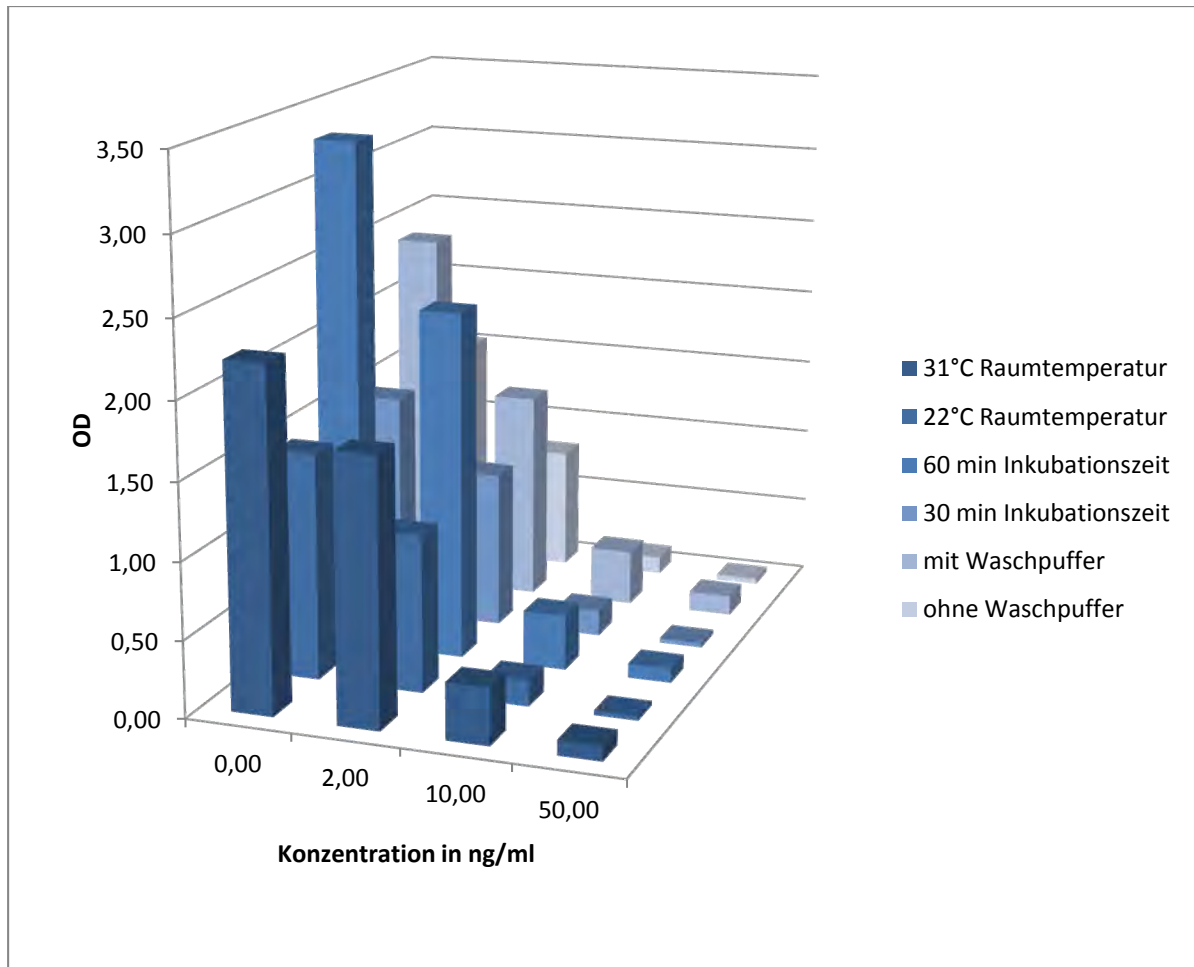
## 5.7 Cannabinoide

Konzentration in ng/ml	OD	cv	OD	cv
0	3,32	1,46	1,48	5,88
2	2,27	2,30	1,03	3,80
10	0,36	2,53	0,17	21,61
50	0,09	4,59	0,03	37,37
	30 min Inkubationszeit		60 min Inkubationszeit	

**Abbildung 65: Einfluss der Inkubationszeit auf die ODs der THC-EIAs**

In Abbildung 65 ist deutlich eine Erhöhung der optischen Dichten nach 60 Minuten Inkubationszeit vor dem Waschschrift zu sehen. In diesem Versuchsteil wird deutlich dass eine veränderte Inkubationszeit einen direkten Einfluss auf die Ergebnisse hat, da alle Versuchswerte durch erhöhte optische Dichten auffallen. Es ist hiernach notwendig, die Inkubationszeit auf die vorgeschriebenen 30 Minuten zu begrenzen um deutlich erhöhte Werte zu vermeiden.

## 5.7 Cannabinoide



**Abbildung 66: Darstellung der optischen Dichten unter verschiedenen Versuchsbedingungen geordnet nach Kalibrator und Testparameterbedingung**

## 5.7 Cannabinoide

### 5.7.5 Bewertung der statistischen Signifikanz

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse der THC-Mikroplatten ist in Abbildung 67 ersichtlich.

Die Konfidenzintervalle der Konzentrationslevels überschneiden sich in keinem Falle. Der Unterschied zwischen den einzelnen Intervallen ist deutlich, was eine sehr gute statistische Signifikanz der Werte begründet.

Konzentration	Konfidenz	Konfidenz-Intervall MW± Konfidenz	Obergrenze	Untergrenze
0 ng/ml	0,06	1,78±0,06	1,90	1,66
25 ng/ml	0,14	0,94±0,14	1,22	0,66
100 ng/ml	0,01	0,14±0,01	0,17	0,12
500 ng/ml	0,00	0,04±0,00	0,04	0,03

Abbildung 67: Die Konfidenzintervalle der THC-EIAs unter Normalbedingungen

## 5.7 Cannabinoide

### THC-Enzymimmunoassay

**Kalibratorsubstanz:** 11-nor- $\Delta^9$ -THC-9-COOH

**Cutoff:** 2 ng/ml

**Untere Nachweisgrenze mittels EIA:** 1 ng/ml

**Messbereich im EIA:** 0-50 ng/ml

**Pipettierschema der Proben und Kalibratoren in ng/ml eines Versuchs:**

**Testbedingungen laut Hersteller:**

	A	B	C	D
1	0	0	0	Kalibratorsubstanzen zur Erstellung der Kalibrationskurve
2	2	2	2	
3	10	10	10	
4	50	50	50	
5	0	0	0	Native Probenvolumina, in diesem Fall Kalibratorsubstanzen
6	2	2	2	
7	10	10	10	
8	50	50	50	

- Raumtemperatur ( 22°C)
- Keine Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- 30 Min Inkubationszeit

**Zur Ermittlung der Einflüsse wurden folgende Testbedingungen verändert:**

- Raumtemperatur auf 31°C erhöht
- Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung
- Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 Min

Konzentration	n	MW	S	cv in %	MW+S	MW-S	Proben in diesem Bereich sind	MW	cv in%	MW	cv in%	MW	cv in %
0 ng/ml	6	1,78	0,32	17,81	2,42	1,14	Negativ	2,22	6,89	3,32	1,46	2,41	2,93
2 ng/ml	5	0,94	0,39	41,39	1,72	0,16	Positiv/Negativ	1,73	1,26	2,27	2,30	1,37	3,23
10 ng/ml	5	0,14	0,04	25,54	0,22	0,06	Positiv	0,37	6,43	0,36	2,53	0,36	9,78
50 ng/ml	6	0,04	0,01	31,40	0,06	0,02	Positiv	0,10	2,37	0,09	4,59	0,13	8,80
		Inter-Assay-Präzision							Beispiel bei 31°C Raumtemperatur		Beispiel Mit 60 Min Inkubationszeit		Beispiel unter Nutzung von Waschpuffer

## 5.7 Cannabinoide

<b>Intra-Assay-Präzision:</b>	3	<b>Einfluss des Waschpuffers:</b>	Ca. 90% →A+
<b>Inter-Assay-Präzision:</b>	3	<b>Einfluss der verlängerten Inkubationszeit:</b>	Ca. 103%→A+
<b>Differenzierbarkeit der Ergebnisse:</b>	4	<b>Einfluss der erhöhten Umgebungstemperatur:</b>	→D
<b>Signifikanz (Konfidenzintervalle):</b>	2		

*Es wird der Mittelwert der jeweiligen Konzentrationslevel eingesetzt und daraus ein Mittelwert gebildet, wenn beide Versuche diesbezüglich eine Veränderung der Werte nach sich zog.*

1-max. cv in % < 20% oder sehr gut

$$\mathbf{A+} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 60\% \text{ (sehr hoher Einfluss)}$$

2- max. cv in % < 30% oder gut

$$\mathbf{A-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 40\% \text{ (hoher Einfluss)}$$

3- max. cv in % ≤ 45% oder befriedigend

$$\mathbf{B-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) > 20\% \text{ (wenig Einfluss)}$$

4- max. cv in % < 50% oder ausreichend

$$\mathbf{C-} - \left( \frac{100}{MW(\text{Inter-Assay-Präzision})} \times MW(\text{veränderte Testbedingung}) - 100\% \right) \leq 20\% \text{ (kaum Einfluss)}$$

5- max. cv in % > 65% oder ungenügend

**D-** nicht eindeutig nachweisbarer Einfluss

## 6 Zusammenfassung und Diskussion

### 6.1 Diskussion

Um die folgende Diskussion zu unterstützen, befindet sich in Abbildung 68 eine Darstellung der wichtigsten Untersuchungsergebnisse der genutzten EIAs. Der Intended Use ist in der vorliegenden Arbeit, wie erwähnt, die eindeutige Identifikation von positiven und negativen Probenvolumina bezüglich der zu detektierenden Substanz.

Substanz	Konzentration	MW	S	cv in %	MW-S	MW+S
Amphetamine	0 ng/ml	1,84	0,37	20,23	1,46	2,21
	25 ng/ml	0,46	0,11	24,75	0,34	0,57
	100 ng/ml	0,31	0,11	29,35	0,19	0,42
	500 ng/ml	0,13	0,06	42,80	0,07	0,19
Benzodiazepine	0 ng/ml	2,07	0,37	17,61	1,70	2,44
	10 ng/ml	1,26	0,16	12,61	1,10	1,42
	100 ng/ml	0,50	0,11	22,39	0,39	0,61
	500 ng/ml	0,23	0,08	36,13	0,15	0,31
Buprenorphine	0 ng/ml	1,79	0,43	24,01	1,36	2,22
	0,5 ng/ml	0,56	0,12	21,21	0,44	0,68
	1 ng/ml	0,32	0,10	30,02	0,22	0,42
	5 ng/ml	0,12	0,03	22,70	0,09	0,15

## 6.1 Diskussion

Substanz	Konzentration	MW	S	cv in %	MW-S	MW+S
Kokain	0 ng/ml	2,13	0,40	18,72	1,73	2,53
	10 ng/ml	1,09	0,21	20,13	0,88	1,30
	50 ng/ml	0,35	0,06	17,69	0,29	0,41
	300 ng/ml	0,10	0,04	37,43	0,06	0,14
Methamphetamine	0 ng/ml	2,22	0,48	21,82	1,74	2,70
	25 ng/ml	1,12	0,24	21,30	0,88	1,36
	100 ng/ml	0,50	0,09	17,92	0,41	0,59
	500 ng/ml	0,14	0,03	21,36	0,11	0,17
Methadon	0 ng/ml	2,33	0,19	8,33	2,14	2,52
	5 ng/ml	1,17	0,47	40,17	0,70	1,64
	25 ng/ml	0,43	0,27	63,64	0,16	0,70
	100 ng/ml	0,06	0,03	51,12	0,03	0,09
Cannabinoide	0 ng/ml	1,78	0,32	17,81	1,14	2,42
	2 ng/ml	0,94	0,39	41,39	0,16	1,72
	10 ng/ml	0,14	0,04	25,54	0,06	0,22
	50 ng/ml	0,04	0,01	31,40	0,02	0,06

**Abbildung 68: Zusammenfassung der Mittelwerte, mittleren Standardabweichungen, Variationskoeffizienten, 95%-Intervalle der Messergebnisse der EIAs unter Normalbedingungen**



## 6.1 Diskussion

### 6.1.1 Amphetamine

Die Amphetamin-EIAs besitzen Abweichungen kleiner 45% ausgehend von den Messwert-Mittelwerten und deren Standardabweichungen. Für den Cut-Off-Kalibrator (25 ng/ml) wurden Ergebnisse ermittelt, deren 1s-Intervall sich nicht mit dem des Negativ-Kalibrators überschneidet.

Die Möglichkeit zur klaren Entscheidung bezüglich des Vorhandenseins der zu detektierenden Substanz im Probenvolumen wird ermöglicht. Hiernach können negative Ergebnisse als solche gewertet werden, während positive Ergebnisse, wie in Kapitel 1 erwähnt, anhand der Bestätigungsanalytik mittels GC/MS bestätigt werden müssen um gerichtlich anerkannte Ergebnisse zu erhalten. Die Robustheit der EIAs gegenüber variierenden Testbedingungen ist als hoch zu bezeichnen. Sowohl die Nutzung von Waschpuffer in der Spüllösung als auch die Erhöhung der Umgebungstemperatur zeigt keine reproduzierbaren Einflüsse auf die Ergebnisse der Tests.

Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min birgt einen reproduzierbaren Einfluss auf die optischen Dichten der AMP-EIAs. Demzufolge bewegen sich die Ergebnisse der Versuche mit Amphetamin-EIAs auch bei variierenden Testbedingungen innerhalb absehbarer Grenzen, welche in Abbildung 68 sowie in dem Kapitel 5.1 detailliert ersichtlich sind.

### 6.1.2 Benzodiazepine

Die Benzodiazepin-EIAs erzielten innerhalb der Versuche Variationskoeffizienten kleiner 40% für die Mittelwerte und Standardabweichungen unter Versuchsbedingungen nach Vorgabe des Herstellers.

Die 1s-Bereiche des Cut-Off-Kalibrators (10 ng/ml) und des Negativ-Kalibrators überschneiden sich nicht. Die übrigen Bereiche der verwendeten Kalibratorniveaus zeichnen sich durch gute Differenzierbarkeit aus. Dadurch ist die Möglichkeit zur deutlichen Unterscheidung zwischen positiven und negativen Probenvolumina gegeben. Negative Proben können hiernach als solche gewertet werden und positive müssen zur Erlangung gerichtlich verwertbarer Ergebnisse mittels Bestätigungsanalytik bestimmt werden.

Die Robustheit der BZO-EIAs ist als hoch zu bezeichnen. Die Ergebnisse werden weder durch die Nutzung von Waschpuffer in der Spüllösung noch durch die Erhöhung der

## 6.1 Diskussion

Umgebungstemperatur reproduzierbar und eindeutig beeinflusst. Die Erhöhung der Inkubationszeit auf 60 min vor dem Waschvorgang erzielt eine reproduzierbare und deutliche Erhöhung der Werte. Demnach sind die BZO-EIAs gegenüber variierenden Testbedingungen befriedigend robust und erzielen vorhersehbare Ergebnisse innerhalb der in Abbildung 68 dargestellten Grenzen. Die detaillierten Ergebnisse diesbezüglich sind in Kapitel 5.2 ersichtlich.

### 6.1.3 Buprenorphine

Die Versuche mit Buprenorphin-EIAs, wie in Abbildung 69 visualisiert, erzielten Abweichungen von kleiner 35%. Diese Angabe erschließt sich aus den Mittelwerten sowie Standardabweichungen aller Versuche unter Normalbedingungen. Demnach überschneiden sich die 1s-Intervalle des Cut-Off-Kalibrators (0,5 ng/ml) und des Null-Kalibrators nicht. Daraus schlussfolgernd kann eine eindeutige Unterscheidung zwischen positiven und negativen Proben erfolgen, wodurch der erwähnte Intended Use der EIAs erfüllt wird.

Ebenfalls gibt es ausreichend differenzierbare Intervalle der übrigen Positiv-Kontrollen. Die Bestätigungsanalytik muss bei positiven Probenvolumina weiterhin durchgeführt werden um rechtlich verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Negative Ergebnisse jedoch können anhand dieses Testverfahrens als solche gewertet werden.

Die Robustheit der Buprenorphin-EIAs wird in Kapitel 5.3 detailliert beschrieben. Zusammenfassend sind die BUP-EIAs bezüglich der Robustheit als ausreichend zu bezeichnen. Sowohl die Inkubationszeit vor dem Waschschritt als auch die Umgebungstemperatur beeinflussen die Versuche reproduzierbar. Die Nutzung von Waschpuffer in der Spüllösung konnte keinen eindeutigen Einfluss erzielen. Es ist hierbei demnach darauf zu achten, dass die vom Hersteller vorgeschriebenen Testbedingungen eingehalten werden, um außerordentliche Ergebnisse zu vermeiden. Die Grenzen der Ergebnisse aus Abbildung 68 können nur unter den erwähnten Bedingungen erzielt werden.

## 6.1 Diskussion

### 6.1.4 Kokain

Die Kokain-EIAs erzielten innerhalb aller Versuche Abweichungen unter 40%. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichten liegen nach den Angaben der Abbildung 68 nicht breit gestreut. Es ist möglich eine eindeutige Unterscheidung zwischen negativen und positiven Proben zu machen, da sich das 1s-Intervall des Cut-Off-Kalibrators (10 ng/ml) nicht mit dem des Negativ-Kalibrators überschneidet. Die übrigen Intervalle können ebenfalls eindeutig voneinander differenziert werden. Demnach können negative Ergebnisse als solche gewertet werden, während aber positive Ergebnisse, um gerichtlich verwertbar zu sein, mittels GC/MS bestätigt werden müssen.

Bezüglich der Robustheit der Kokain-EIAs ist festzustellen, dass die durchgeführten Ergebnisse eine hohe Robustheit gegenüber variierenden Testbedingungen bestätigen. Weder die Umgebungstemperatur noch die Erhöhung der Inkubationszeit vor dem Waschschrift haben einen reproduzierbaren und eindeutigen Einfluss auf die Ergebnisse der EIAs. Nur die Nutzung von Waschpuffer konnte eine reproduzierbare Erhöhung der optischen Dichten erzielen. Demzufolge können die Kokain-EIAs vorhersehbare Ergebnisse innerhalb der Grenzen, welche in Abbildung 68 und Kapitel 5.4 verdeutlicht werden, produzieren.

### 6.1.5 Methamphetamine

Für die Methamphetamine-EIAs wurden Abweichungen kleiner 25% für alle Versuche unter Normalbedingungen ermittelt. Die Ergebnisse liegen demnach sehr konstant in einem kleinen Bereich um die in Abbildung 68 dargestellten Mittelwerte und deren Standardabweichungen. Das Wertintervall des Null-Kalibrators überschneidet sich nicht mit dem des Cut-Off-Kalibrators (25 ng/ml). Somit ist eine ausreichende Differenzierbarkeit der Ergebnisse möglich, wodurch der Intended Use erfüllt wird.

Der Intended Use ist in der vorliegenden Arbeit, wie erwähnt, die eindeutige Identifikation von positiven und negativen Probenvolumina bezüglich der zu detektierenden Substanz.

Die Robustheit der Methamphetamine-EIAs ist als gering anzusehen. Sowohl die Verlängerung der Inkubationszeit als auch die Nutzung von Waschpuffer erzielen eine Erhöhung der optischen Dichten. Auf Änderungen der Umgebungstemperatur reagieren die EIAs nicht eindeutig reproduzierbar. Demnach beeinflussen die variierenden

## 6.1 Diskussion

Testbedingungen die Methamphetamin-EIAs. Die detaillierten Auswirkungen der genannten Einflüsse werden in dem Kapitel 5.5 beschrieben.

### 6.1.6 Methadon

Für Methadon-EIAs wurden Abweichungen größer 60% generiert. Die Standardabweichungen und Mittelwerte der Versuche unter den vom Hersteller vorgegebenen Bedingungen erzielten demnach Ergebnisse, die in Abbildung 68 dargestellt werden und einen breit gestreut sind. Das 1s-Intervall des Cut-Off-Kalibrators (5 ng/ml) hat keine Überschneidung mit dem des Negativ-Kalibrators. Somit sind durch dieses Testverfahren als negativ identifizierte Ergebnisse als diese zu werten und positive Ergebnisse weiterhin, um rechtlich anerkannte Ergebnisse zu erlangen, der Bestätigungsanalytik zu zuführen.

Bezüglich der Robustheit können die untersuchten MTD-EIAs große Schwankungen erzielen. Die Robustheit ist als sehr gering zu bezeichnen, da sowohl die Veränderung der Umgebungstemperatur, der Inkubationszeit und die Nutzung von Waschpuffer eine eindeutige und reproduzierbare Beeinflussung der optischen Dichten erzielt. In jedem Falle werden die Werte erhöht und erzeugen sogar außerhalb des Messbereichs gelegene Ergebnisse. Versuche mit Methadon-EIAs sind demnach unbedingt unter Bedingungen, laut Hersteller durchzuführen. Das Kapitel 5.6 beschreibt detailliert die Einflüsse der verschiedenen Testbedingungen auf die MTD-EIAs.

### 6.1.7 Cannabinoide

Die THC-EIAs konnten Abweichungen kleiner 45% erzielen anhand der Mittelwerte und deren Standardabweichungen unter Normalbedingungen.

Der 1s-Bereich des Null-Kalibrators überschneidet sich nicht mit dem des Cut-Off-Kalibrators (2 ng/ml) und somit ist eine eindeutige Identifikation von positiven und negativen Proben möglich. Der Intended Use ist demnach gegeben, während positive Ergebnisse jedoch mittels GC/MS bestätigt werden müssen um gerichtlich anerkannt zu werden.

Die THC-EIAs konnten durch die Verlängerung der Inkubationszeit sowie durch die Nutzung von Waschpuffer deutlich und reproduzierbar beeinflusst werden. Obwohl die Änderung der

## 6.1 Diskussion

Temperatur keine Veränderung der optischen Dichten nach sich zog, können die THC-EIAs als ausreichend robust bezeichnet werden. Dies begründet sich in der deutlichen Beeinflussung durch Inkubationszeitverlängerung und Waschpuffernutzung. Die detaillierten Beschreibungen dieser Einflüsse sind in Kapitel 5.7 dargestellt.

### 6.2 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden EIAs verschiedener Substanzen bezüglich ihrer Präzision, Signifikanz, Robustheit und Differenzierbarkeit der Messwert-Intervalle untersucht. Zu diesem Zweck wurden mit Inspec-EIA-Mikroplatten mehrere Versuche nach der vom Hersteller vorgegebenen Testdurchführung mit Kalibratorsubstanzen ausgeführt. Anhand der hiernach generierten Daten wurden die Präzision pro Tag sowie die Präzision über den Versuchszeitraum hinweg ermittelt. Aus diesen Angaben konnte wiederum die Differenzierbarkeit der Messwtergebnisse durch statistische Berechnungen ermittelt werden.

Diese ist wichtig um den Intended Use, die eindeutige Entscheidung zwischen Vorhandensein und Nichtvorhandensein der gesuchten Substanz im Probenvolumen, zu ermöglichen. Der ebenfalls erstellte Konfidenzintervall wurde erstellt um die Signifikanz der Messwerte darzustellen.

Die Robustheit der EIAs wurde untersucht anhand der Änderung verschiedener Testbedingungen. Es wurden sowohl die Inkubationszeit vor dem ersten Waschschrift, die Umgebungstemperatur während der Versuchsdurchführung als auch die Nutzung von Waschpuffer in der Waschlösung variiert. Die Auswirkung dieser Veränderungen auf die Ergebnisse der Versuche wurde somit als Indikator der Robustheit der Detektionssysteme genutzt.

Für alle untersuchten EIAs konnte festgestellt werden, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchen unter Normalbedingungen gibt. Somit kann für alle EIAs, welche mit vom Hersteller vorgegebenen Versuchsbedingungen genutzt werden, eine ausreichende Reproduzierbarkeit angenommen werden. Zusätzlich wird der Intended Use dadurch gewährleistet, dass bei jedem Versuche eine Kalibration durchgeführt wird.

Bei geringen Veränderungen im Versuchsablauf und mehrmaliger Durchführung der Versuche wurden deutliche Unterschiede ausgemacht. Diese besagt, dass es eine deutliche Änderung des untersuchten Merkmals gibt. Eine zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse ist zusätzlich im Anhang zu finden. Hierbei werden die generierten Wertintervalle, Ergebnisse und daraus resultierende Schlussfolgerungen in Kurzform dargestellt.

## 6.2 Zusammenfassung

Der Einfluss der Temperatur, des Waschpuffers und der Inkubationszeit auf die Ergebnisse der EIAs ist in einigen Fällen deutlich erkennbar. Die detaillierte Beschreibung der Auswirkungen befindet sich in Kapitel 5. Resultierend lässt sich sagen, dass eine Detektion der gesuchten Substanzen im Probenvolumen in jedem Fall gewährleistet ist, da bei jedem Versuch eine Kalibration durchgeführt wird, anhand welcher individuell Ergebnisse generiert werden. Selbst bei hohen Abweichungen zwischen den Versuchen kann der Anwender anhand der spezifischen Kalibrationskurve Ergebnisse erlangen und interpretieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle getesteten EIAs unter Normalbedingungen präzise, eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse erzielen. Die vom Hersteller vorgegebenen Versuchsbedingungen müssen eingehalten werden. Durch Variation der Umgebungsbedingungen können die Ergebnisse stark beeinflusst werden, aber durch die Nutzung von Kalibratoren nicht zu falschen Resultaten führen.

## 7 Glossar

### **Bestimmungsgrenzen:**

Die Bestimmungsgrenze ist von [SCD 12] definiert als ein Limit, bis zu dem eine Konzentration quantitativ unter den angegebenen Unsicherheiten noch bestimmt werden kann. Diese wurde im Folgenden nicht detailliert betrachtet, jedoch hier der Vollständigkeit halber erwähnt.

### **Cutoff:**

Der Cutoff wird auch als *Entscheidungsgrenze* bezeichnet und kann um ein Vielfaches höher sein als die Nachweisgrenze um falsch positive Resultate zu vermeiden. Diese Grenze wird mit einer festgelegten Konzentrationsmenge pro Einheit der jeweiligen Kalibratorsubstanz definiert und dient als Entscheidungsgrenze. Unterhalb des Cutoffs werden Ergebnisse als negativ und oberhalb als positiv identifiziert.

### **Genauigkeit:**

„Genauigkeit ist die qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der Annäherung von Analyseergebnissen an den Bezugswert“ [RAE 06] Hier sind Präzision und Richtigkeit zusammengefasst betrachtet was bedeutet, dass die Genauigkeit durch zufällige und systematische Fehlerkomponenten beeinflusst wird [SCD 12].

### **Konfidenzintervall:**

Der Konfidenzintervall wird auch Vertrauensintervall- oder Bereich genannt. Nach [PAP 03] befindet sich in diesem Intervall, mit einer festgelegten Wahrscheinlichkeit, der unbekannte wahre Wert bzw. Erwartungswert der normalverteilten Meßgröße. Der Zahlenfaktor t kann in geeigneten Tabellen abgelesen werden. In diesen Tabellen werden t-Werte in Abhängigkeit der Anzahl der Messwerte und des Vertrauensniveaus angegeben. Das Vertrauensniveau wurde in der vorliegenden Arbeit für die Konfidenzintervallberechnung von den vorhergehenden 68% Irrtumswahrscheinlichkeit auf 95% erhöht.

$$\text{Konfidenzgrenzen: } \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}$$



**Messunsicherheit:**

Die Messunsicherheit gibt die Streuung der Messergebnisse an [SCD 12] und wird in diesem Fall mit der Standardabweichung aller Messergebnisse über den Versuchszeitraum angegeben. Je geringer der Wertebereich ist, desto leistungsfähiger und robuster ist das Analysesystem.

**Mittelwert:**

Ist der „günstigste Schätzwert für den „wahren“ Wert der Meßgröße“ [PAP 03]

$$\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \bar{x}$$

**Nachweisgrenzen:**

Die Nachweisgrenze bestimmt die kleinste qualitativ nachweisbare Konzentration des gesuchten Analyten im Probenvolumen.[RAE 06]

**Präzision:**

Die Präzision, auch Reproduzierbarkeit, von Ergebnissen ist von [RAE 06] definiert als die Übereinstimmung von unter festgelegten Bedingungen erhaltenen Resultaten und kann unterschieden werden in:

Intra-Assay-Präzision: Präzision innerhalb einer Serie (Wiederholpräzision) und gibt Auskunft über das Maß der zufälligen Fehler.

Inter-Assay-Präzision: Präzision von Tag zu Tag oder von Serie zu Serie unter bewusster Änderung von bestimmten Parametern.

Vergleichspräzision: Präzision von verschiedenen Laboratorien und verschiedenen Anwendern sowie verschiedenen Geräten.

**Selektivität:**

Die Selektivität eines Analysesystems wird durch die Eignung verschiedener nebeneinander zu detektierende Probenvolumina ohne die Störung untereinander eindeutig identifizieren zu können, definiert. [MAH 11]

**Sensitivität:**

Die Sensitivität ist die Kompetenz eines Analysesystems angrenzende Konzentrationswerte ausreichend zu differenzieren [RAE 06] um eine möglichst genaue Aussage treffen zu können.

**Stabilität:**

Die Robustheit eines Immunoassays spiegelt sich in der „Toleranz gegenüber kleineren Schwankungen innerhalb des Verfahrensablaufes“ [RAE 06] wider. Die beeinflussenden Faktoren sind in großer Zahl existent, in dieser Arbeit wurden jedoch, wie oben erwähnt, Temperatur, Inkubationszeit und Waschpuffersysteme variiert, um die Stabilität genauer zu untersuchen.

**Standardabweichung:**

Ist die Abweichung von Messwerten vom Mittelwert [PAP 03] 
$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = S$$

**Statistische Signifikanz:**

Die statistische Signifikanz gibt an ob sich die Konfidenzintervalle der verschiedenen Konzentrationen deutlich unterscheiden oder überschneiden.

**Variationskoeffizient:**

Ist die prozentuale Darstellung der Standardabweichung vom Mittelwert. Sie wird mit der

Formel  $cv = \frac{S}{MW} = \frac{S}{\bar{x}}$  berechnet.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unfälle mit Personenschaden im Jahr 2011 in %, bei welchen mindestens ein Beteiligter unter dem Einfluss von Alkohol oder illegalen Drogen stand. Insgesamt wurden im Jahr 2011, laut dem statistischen Bundesamt [SBA 12], 2,4 Millionen Unfälle von der Polizei registriert. ....	1
Abbildung 2: pharmazeutische Einteilung von Drogen und Medikamenten [MAH 13] .....	3
Abbildung 3: Der Messbereich, Untere Nachweisgrenze und Cutoffs (vom Hersteller empfohlen und vom Vertreiber empfohlene) von Inspec-Drogen- EIAs geordnet nach Substanzen nach [MAH 11].....	7
Abbildung 4: Einteilung von EIAs nach Art und Weise der Ergebniserlangung und diesbezüglichen chemischen Reaktionen .....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung des chemischen Prinzips eines EIAs bei der Versuchsdurchführung nach Mahsan [MAH 11].....	11
Abbildung 6: Die Mikroplatte nach Zugabe der Kalibratoren, Proben sowie der Konjugatsubstanz. Hier wurden 8 Triplikate erstellt. Nach diesem Schritt wird die Platte 30 Min inkubiert und danach der Waschschrift vollzogen. ....	12
Abbildung 7: Die Mikroplatte nach dem Waschvorgang und nach Substratzugabe zeigt eine Blauverfärbung. Die Farbgebung ist umgekehrt proportional zu dem Gehalt der zu detektierenden Substanz im Probenvolumen.....	12
Abbildung 8: Die Mikroplatte wird innerhalb von 15 Minuten mit dem Photometer gemessen und zeigt eine Gelbfärbung nach Zugabe der Stopplösung. ....	12
Abbildung 9: TECAN Spectra II Microplate Reader [LAB 13].....	15
Abbildung 10: Übersicht der Störfaktoren und deren Ursachen auf EIAs [LUT 09] .....	16
Abbildung 11: Die Werte von zwischen 0ng/ml und 25 ng/ml sind differenzierbar, da die Differenz zwischen beiden Ergebnissen größer 0 ist. Die Differenzierbarkeit zwischen 25 ng/ml und 100 ng/ml ist nicht gegeben, da die Differenz negativ ist. Die Differenzierbarkeit zwischen 100 ng/ml und 500 ng/ml ist nicht gegeben, da die Differenz 0 ist. ....	22

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 12: Intra-Assay-Präzision von Well zu Well unter Angabe von MA, S, cv und n der unabhängigen Versuche .....	24
Abbildung 13: Inter-Assay-Präzision von Amphetamin-EIA-Versuchen anhand der Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten der Ergebnisse aller Versuche unter Normalbedingungen und Anzahl der Versuchstage.....	24
Abbildung 14: Differenzierbarkeit der Ergebnisse verschiedener Konzentrationslevel unter Angabe des Mittelwertes und dem 1S-Intervall der AMP-EIAs unter Normalbedingungen ...	25
Abbildung 15: Versuchsserien bei Amphetamin-EIAs mit und ohne Waschpuffer durch Angabe der mittleren optischen Dichte der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuchsdurchlauf	26
Abbildung 16: Versuchsserien bei 31°C und 22°C Umgebungstemperatur unter Angabe der mittleren optischen Dichte der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuchsdurchlauf .....	27
Abbildung 17 Auswirkung der Inkubationszeit auf die optische Dichte, dargestellt durch die mittleren ODs sowie Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse des jeweiligen Tests .....	27
Abbildung 18: Darstellung der optischen Dichten unter verschiedenen Testbedingungen pro Konzentrationslevel .....	28
Abbildung 19: Darstellung des Konfidenzintervalls der Amphetaminmikroplatten und die sich dadurch ergebenden Intervallgrenzen mit $\alpha=0,05$ (siehe Kapitel 4).....	29
Abbildung 20: Darstellung der Intra-Assay-Präzision pro Tag als Variationskoeffizient in Prozent durch Angabe der Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten und Anzahl der Ergebnisse des Versuchs des jeweiligen Tages.....	33
Abbildung 21: Die Inter-Assay-Präzision aller Versuche unter wird angegeben durch den Mittelwert, die Standardabweichung, den daraus folgenden Variationskoeffizienten und die Anzahl der einfließenden Versuche unter Normalbedingungen.....	34
Abbildung 22: Differenzierbarkeit der Ergebnisse anhand des Mittelwertes der OD aller Versuche unter Normalbedingungen dargestellt anhand einer Wertetabelle sowie einem Balkendiagramm um die Differenzierbarkeit der Ergebnis-Intervalle zu visualisieren.....	35

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 23: Der Einfluss der Inkubationszeit auf die optischen Dichten der Benzodiazepin-EIAs durch Darstellung der Mittelwerte der ODs pro Versuch der jeweiligen Versuchsbedingung.....	36
Abbildung 24: Versuchsserien bei 31°C und 22°C Umgebungstemperatur unter Angabe der mittleren optischen Dichte und deren cv der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuchsdurchlauf .....	37
Abbildung 25: Vergleich von Versuchen mit Benzodiazepin-EIAs mit und ohne Waschpuffer unter Angabe der Mittelwerte der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuch und den daraus entstehenden Variationskoeffizienten .....	37
Abbildung 26: Darstellung der optischen Dichten unter verschiedenen Testbedingungen pro Kalibratorlevel.....	38
Abbildung 27: Darstellung der Konfidenzintervalle der BZO-EIAs unter Angabe der Intervallgrenzen zur Verdeutlichung des signifikanten Unterschieds der Intervalle .....	39
Abbildung 28: Intra-Assay-Präzision von Well zu Well unter Angabe des Mittelwertes der Ergebnisse pro Versuch, deren Standardabweichung, Variationskoeffizient und Anzahl der Ergebnisse pro Tag .....	43
Abbildung 29: Inter-Assay-Präzision der Buprenorphin-EIAs unter Angabe der Mittelwerte, Standardabweichungen und daraus resultierenden Variationskoeffizienten aller generierten Ergebnisse unter Normalbedingungen.....	44
Abbildung 30: Differenzierbarkeit der Ergebnisse von BUP-EIAs unter Angabe der Mittelwerte und der $1\sigma$ -Intervalle.....	45
Abbildung 31: Vergleich von Versuchen mit Benzodiazepin-EIAs mit und ohne Waschpuffer unter Angabe der Mittelwerte der jeweiligen 6 Ergebnisse pro Versuch und den daraus entstehenden Variationskoeffizienten .....	46
Abbildung 32: Auswirkung der Temperaturänderungen durch Angabe der Mittelwerte der 6 Ergebnisse des jeweiligen Versuchs unter variierenden Testbedingungen, wie der Umgebungstemperatur.....	47

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 33: Einfluss der Inkubationszeit auf die ODs unter Darstellung des Mittelwertes der 6 Ergebnisse der Versuche unter Normalbedingung und unter veränderter Bedingung, hier der verlängerten Inkubationszeit .....	48
Abbildung 34: Darstellung der optischen Dichten unter verschiedenen Versuchsbedingungen geordnet nach Testbedingungen und Konzentrationslevel .....	49
Abbildung 35: Konfidenzintervalle der Inspec-BUP-EIAs.....	50
Abbildung 36: Intra-Assay-Präzision von Well zu Well unter Angabe des Mittelwertes der Ergebnisse pro Versuch, deren Standardabweichung, Variationskoeffizient und Anzahl der Ergebnisse pro Tag.....	53
Abbildung 37: Inter-Assay-Präzision unter Angabe der Anzahl der einfließenden Werte, Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Ergebnisse der Versuche unter Normalbedingungen.....	54
Abbildung 38: Differenzierbarkeit der Ergebnisse ausgehend vom Mittelwert aller Versuche unter Normalbedingungen, sowie deren Standardabweichungen, Variationskoeffizienten anhand einer Darstellung der Werte in einer Tabelle und einem Diagramm zur Visualisierung der Unterschiede zwischen den Intervallen.....	55
Abbildung 39: Auswirkung der Temperaturänderungen durch Angabe der Mittelwerte der 6 Ergebnisse des jeweiligen Versuchs.....	56
Abbildung 40: Einfluss der Inkubationszeit auf die ODs der Kokain-EIAs anhand der exemplarischen Darstellung eines Versuchs unter Normalbedingung und eines mit verlängerter Inkubationszeit .....	57
Abbildung 41: Darstellung der optischen Dichten der Kokain-EIAs ohne Verwendung und mit Verwendung von Waschpuffer mittels der Angabe der mittleren OD der jeweiligen Versuche und deren cvs.....	58
Abbildung 42: Darstellung der optischen Dichten der Kokain-EIAs unter variierenden Testbedingungen geordnet nach den Konzentrationslevels .....	58
Abbildung 43: 95%-Konfidenzintervalle der Kokain-Mikroplatten.....	59

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 44: Darstellung der Variationskoeffizienten, optischen Dichten und deren Standardabweichungen von Well zu Well pro Tag der 6 Ergebnisse der jeweiligen Versuche unter Normalbedingungen.....	62
Abbildung 45: Inter-Assay-Präzision der Methamphetamin-Platten dargestellt durch den Mittelwert aller Ergebnisse, die unter Normalbedingungen generiert wurden, deren Standardabweichungen, den sich daraus ergebenden Variationskoeffizienten und die Anzahl der einfließenden Versuche .....	63
Abbildung 46:Differenzierbarkeit der Ergebnisse der Methamphetamin-Mikrotiterplatten dargestellt anhand einer Wertetabelle mit den Mittelwerten, Standardabweichungen und deren 1s-Intervallen der Ergebnisse aller Versuche unter Normalbedingungen sowie eines Diagramms dieser Werte zur Visualisierung der Differenzierbarkeit.....	64
Abbildung 47: Vergleich von Versuchen unter verschiedenen Umgebungstemperaturen durch das Aufzeigen der mittleren ODs und Variationskoeffizienten der jeweiligen Versuche .....	65
Abbildung 48: Vergleichende Versuche zur Detektion des Einflusses von Waschpuffer auf die optischen Dichten der Methamphetamin-Mikroplatten .....	66
Abbildung 49: Einfluss der Inkubationszeit auf die optischen Dichten der Methamphetamin-EIAs dargestellt durch die Angabe der mittleren ODs und Variationskoeffizienten der jeweiligen Versuche .....	67
Abbildung 50: Einflüsse verschiedener Testbedingungen auf die Ergebnisse der Methamphetamin-EIAs.....	67
Abbildung 51:Konfidenzintervalle der Methamphetamin-EIAs unter Normalbedingungen.....	68
Abbildung 52: Darstellung der Variationskoeffizienten, mittleren ODs und deren Standardabweichungen von Well zu Well pro Tag der Methadon-EIAs unter Normalbedingungen.....	71
Abbildung 53: Inter-Assay-Präzision der MTD-EIAs unter Angabe des Mittelwertes, der Standardabweichung und des daraus folgenden Variationskoeffizienten aller generierten Ergebnisse pro Konzentrationslevel unter Normalbedingungen .....	72

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 54: Die Differenzierbarkeit der Ergebnisse der Methadon-Mikrotiterplatten anhand einer Wertetabelle, welche die Mittelwerte aller optischen Dichten, deren Standardabweichungen und deren 1 $\sigma$ -Intervalle beinhaltet sowie ein Diagramm zur Visualisierung der Differenzierbarkeit der Intervalle.....	73
Abbildung 55: Vergleich von Versuchen unter verschiedenen Umgebungstemperaturen mittels einer Wertetabelle unter Angabe der mittleren OD und den Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse des jeweiligen Versuchs.....	74
Abbildung 56: Vergleichende Versuche zur Detektion des Einflusses von Waschpuffer auf die optischen Dichten der Methadon-Mikrotiterplatten unter Angabe der mittleren optischen Dichte sowie Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse pro Konzentrationslevel des jeweiligen Versuchs .....	75
Abbildung 57: Der Einfluss der Inkubationszeit auf die optischen Dichten der Methadon-EIAs wird hier anhand der mittleren OD sowie den Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse pro Kalibrator des jeweiligen Versuchs dargestellt.....	76
Abbildung 58: Darstellung der Einflüsse verschiedener Testparametervariationen auf die Methadon-EIAs, geordnet nach den Kalibratorlevels und den jeweiligen Versuchsbedingungen.....	76
Abbildung 59: Konfidenzintervalle der Methadon-EIAs unter Normalbedingungen .....	77
Abbildung 60: Die Intra-Assay-Präzision der THC-EIAs unter Angabe der optischen Dichten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten sowie der Anzahl der einberechneten Vertiefungen.....	80
Abbildung 61: Inter-Assay-Präzision der THC-EIAs unter Angabe der Anzahl der Versuche, Mittelwerte, Standardabweichungen und daraus folgenden Variationskoeffizienten aller Ergebnisse, welche unter Normalbedingungen generiert wurden.....	81
Abbildung 62: Die Differenzierbarkeit der Ergebnisse der THC-Mikrotiterplatten unter Angabe einer Wertetabelle, welche den Mittelwert, die Standardabweichung und die 1 $\sigma$ -Intervalle der Ergebnisse unter Normalbedingungen beinhaltet, und eines Diagramms zur Veranschaulichung der Werte .....	82



## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 63: Einfluss der Verwendung von Waschpuffer auf die Abweichungen und optischen Dichten der THC-EIAs unter Angabe der mittleren ODs sowie den Variationskoeffizienten der 6 Ergebnisse pro Kalibrator des jeweiligen Versuchs.....	83
Abbildung 64: Auswirkung der Temperaturänderungen auf die THC-EIAs unter Angabe der mittleren ODs sowie Variationskoeffizienten der 6 Werte pro Kalibrator des jeweiligen Versuchs .....	84
Abbildung 65:Einfluss der Inkubationszeit auf die ODs der THC-EIAs .....	85
Abbildung 66: Darstellung der optischen Dichten unter verschiedenen Versuchsbedingungen geordnet nach Kalibrator und Testparameterbedingung.....	86
Abbildung 67: Die Konfidenzintervalle der THC-EIAs unter Normalbedingungen.....	87
Abbildung 68: Zusammenfassung der Mittelwerte, mittleren Standardabweichungen, Variationskoeffizienten, 95%-Intervalle der Messergebnisse der EIAs unter Normalbedingungen .....	91

## 9 Literaturverzeichnis

- BUN 12 **Bundesministerium für Gesundheit. 2012.** Gesundheitsgefahren Drogen und Sucht bund. *www.bund.de*. [Online] 11. Oktober 2012. [Zitat vom: 5. 08 2013.] <http://www.bmg.bund.de/praevention/gesundheitsgefahren/sucht-und-drogen.html>.
- CHE 13 **chemgapedia.** Peroxidase-Reaktionen. *www.chemgapedia.de*. [Online] [Zitat vom: 21. 07 2013.] [http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/p/pe/peroxidase\\_00045reaktion.glos.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/p/pe/peroxidase_00045reaktion.glos.html).
- DEU 04 **Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung e.V. 2004.** Unfallverhütungsvorschrift Grundsätze der Prävention. *BG-Vorschrift*. Berlin : Carl Heymanns Verlag, 01. Januar 2004. Bd. BGV A1.
- DEU 13 **Deutscher Verkehrssicherheitsrat. 2013.** Daten und Fakten zur Verkehrssicherheit: Deutscher Verkehrssicherheitsrat. *www.dvr.de*. [Online] 2013. [Zitat vom: 27. 11 2013.] [http://www.dvr.de/betriebe\\_bg/daten/titel.htm](http://www.dvr.de/betriebe_bg/daten/titel.htm).
- DIN 10 **DIN Deutsches Institut für Normung e.V. 2010.** *Internationales Wörterbuch der Metrologie*. Beuth, Berlin, Wien, Zürich : DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 2010.
- DOC 13 **Doccheck. 2013.** Immunität. *www.doccheck.de*. [Online] 2013. [Zitat vom: 09. August 2013.] <http://flexikon.doccheck.com/de/Immunit%C3%A4t>.
- EUR 98 **Europäisches Parlament, Rat. 1998.** ID celex. *EUR-Lex*. [Online] 27. Oktober 1998. [Zitat vom: 4. August 2013.] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31998L0079:DE:NOT>.

## 9 Literaturverzeichnis

- GRE 13                    **Greif, Peter. 2013.** Talent und Ziele. *www.greif.de*. [Online] 2013. [Zitat vom: 4. August 2013.] [http://www.google.de/imgres?imgurl=http://www.greif.de/images/glockenkurve.gif&imgrefurl=http://www.greif.de/nl-talent-und-ziele.html&h=293&w=470&sz=16&tbnid=\\_2y3AvE\\_QxP7QM:&tbnh=79&tbnw=127&zoom=1&usg=\\_\\_4Ck\\_2yFHRomzoB5Tq0PFJRpJGJ8=&docid=hvJNhMuyYd5gGM&s](http://www.google.de/imgres?imgurl=http://www.greif.de/images/glockenkurve.gif&imgrefurl=http://www.greif.de/nl-talent-und-ziele.html&h=293&w=470&sz=16&tbnid=_2y3AvE_QxP7QM:&tbnh=79&tbnw=127&zoom=1&usg=__4Ck_2yFHRomzoB5Tq0PFJRpJGJ8=&docid=hvJNhMuyYd5gGM&s).
- GTF 09                    **GTFCh. 2009.** Richtlinien und Empfehlungen der GTFCh. *Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie*. [Online] 2009. <http://www.gtfc.org>.
- JCG 08                    **JCGM/WG(1). 2008.** [http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf). *bipm*. [Online] 2008. [Zitat vom: 4. August 2013.] <http://www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html>.
- WIL 06                    **John Wiley & Sons. 2006.** scandinavian journal of immunology. *onlinelibrary-wiley*. [Online] 30. Mai 2006. [Zitat vom: 08. August 2013.] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3083.2006.001769.x/full>.
- LAB 13                    **LabX. 1995-2013.** Microplate Readers > Tecan Spectra II Microplate Reader: Tecan: Spectra II: F039047 Tecan. *www.labX.com*. [Online] 1995-2013. [Zitat vom: 24. August 2013.] <http://www.google.de/imgres?client=firefox-a&hs=Zlv&sa=X&rls=org.mozilla:de:official&biw=1366&bih=638&tbn=sch&tbnid=xa6xle0S5sF-6M:&imgrefurl=http://www.labx.com/v2/spiderdealer2/vistasearchdetails.cfm%3Fvid%3D29348318&docid=1ZAV8g-daJamaM&itg=1&imgurl=>.
- LEH 12                    **Lehmacher, Walter. 2012.** *www.uni-köln.de*. [Online] 2012. [Zitat vom: 4. August 2013.] <http://imsieweb.uni-koeln.de/lehre/q1/Q1-06-Konfidenzintervalle.pdf>.
- LUT 09                    **Luttman, Werner. 2009.** *Immunologie*. 3. s.l.: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.

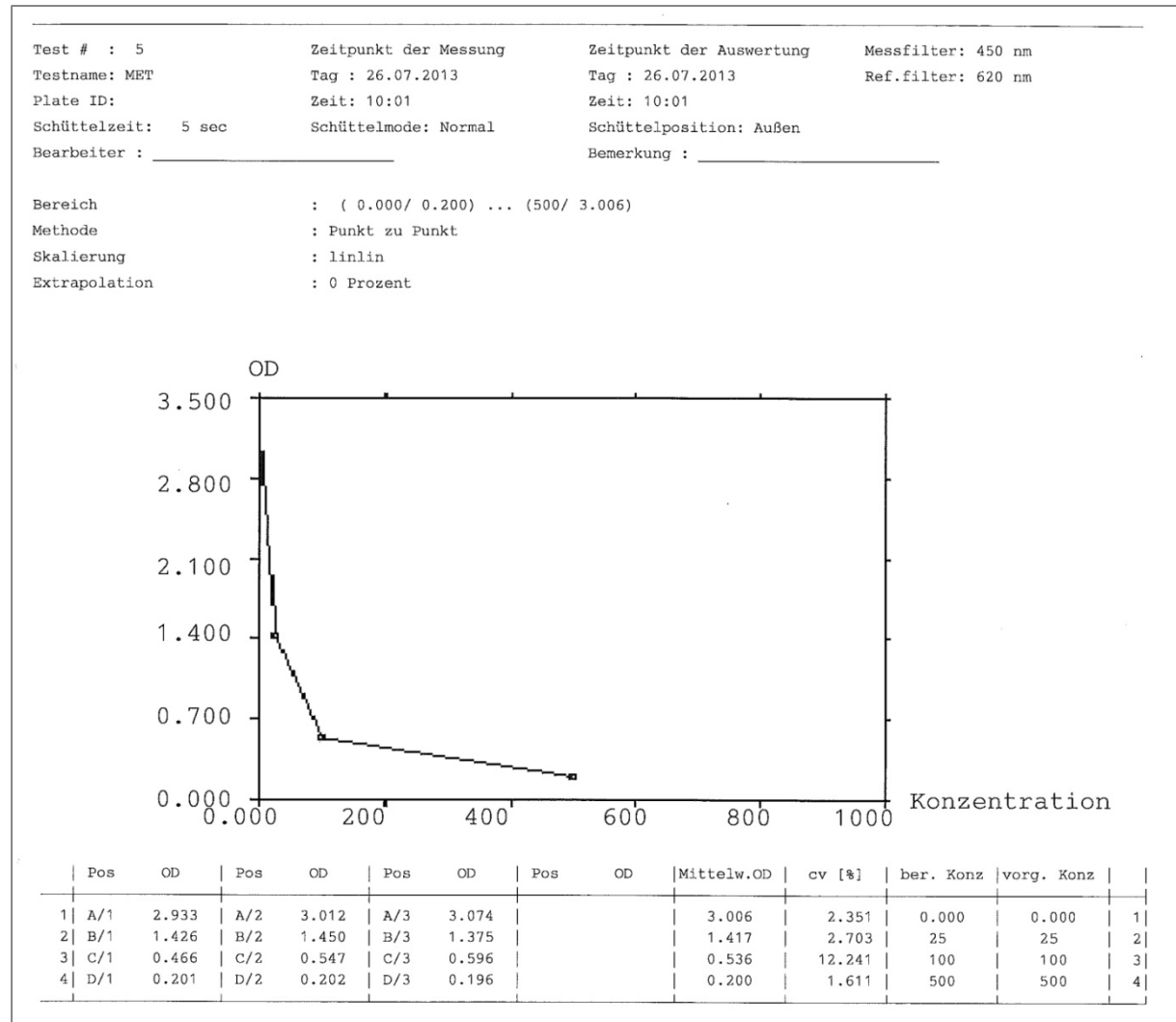
## 9 Literaturverzeichnis

- MAG 08 **Magiera, Eva Sabine. 2008.** *Kritische Untersuchungen zur Bedeutung der Bestätigungsanalyse bei Drogen-Immunoassays und zu Risiken von Sparmaßnahmen beim Drogenscreening.* Gießen, Hessen, Deutschland : s.n., 2008.
- MAH 11 **MAHSAN Diagnostika Vertriebsgesellschaft mbH. 2011.** Katalog für Inspec-Drogen-EIAs 2011/12. Reinbek : s.n., 2011. 4.6, S. 10-11.
- NOB 13 **Nobel Media AB.** Yalow-prizes-medicine- nobelprize. *www.nobel-prizes.org.* [Online] [Zitat vom: 08. 08 2013.] [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1977/yalow-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1977/yalow-bio.html).
- PAP 03 **Papula, Lothar. 2003.** *Mathematische Formelsammlung.* 8. Wiesbaden : Friedr. Vieweg&Sohn Verlag, 2003. S. 293-294.
- RAE 06 **Raem, Arnold und Rauch, Peter. 2006.** *Immunoassays.* s.l. : Spektrum Akademischer Verlag, 2006. S. 247.
- RYC 03 **Ryckmanns, Friedrich-Michael. 2003.** Drogenscreening im Urin mittels Enzymimmunoassays: Methodenvergleich verschiedener Technologien. München, Bayern, Deutschland : s.n., 2003.
- SAN 13 **Sanford-Burnham Medical Research Institute.** talent-pages-sanfordburnham. *www.sanfordburnham.org.* [Online] [Zitat vom: 08. August 2013.] <http://www.sanfordburnham.org/talent/Pages/EvaEngvall.aspx>.
- SCD 12 **SCDAT. 2012.** Richtlinien für die Suchtstoffanalytik. *Swiss Guidelines Committee for Drugs of Abuse Testing, SCDAT.* [Online] 15. November 2012. <http://www.scdat.ch>.
- SEL 07 **Sellrie, Frank. 2007.** opus.kobv.de. [Online] 2007. [Zitat vom: 3. 08 2013.] [http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1598/pdf/sellrie\\_diss.pdf](http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1598/pdf/sellrie_diss.pdf).
- STA 12 **Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. 2012.** Alkoholunfälle im Straßenverkehr - Ältere Ausgaben:Statistisches Bundesamt. *www.destatis.de.* [Online] 17. 10 2012. [Zitat vom: 27. 11 2013.] [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/TransportVerkehr/Verkehrsunfaelle/UnfaelleAlkohol5462404117004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/TransportVerkehr/Verkehrsunfaelle/UnfaelleAlkohol5462404117004.pdf?__blob=publicationFile).



## 10 Anhang

AI: Protokollausdruck nach erfolgter Messung



# 10 Anhang

Test # : 5                                      Zeitpunkt der Messung                                      Zeitpunkt der Auswertung                                      Messfilter: 450 nm  
 Testname: MET                                      Tag : 26.07.2013                                      Tag : 26.07.2013                                      Ref.filter: 620 nm  
 Plate ID:                                      Zeit: 10:01                                      Zeit: 10:01  
 Schüttelzeit: 5 sec                                      Schüttelmode: Normal                                      Schüttelposition: Außen  
 Bearbeiter : \_\_\_\_\_                                      Bemerkung : \_\_\_\_\_

## Proben

	ID	Pos	OD	Pos	OD	Pos	OD	Pos	OD	Mittelw.OD	cv [%]	ber. Konz	
1		E/1	2.650	E/2	2.698	E/3	2.781			2.710	2.446	4.667	1
2		F/1	1.323	F/2	1.370	F/3	1.379			1.357	2.216	30.081	2
3		G/1	0.536	G/2	0.555	G/3	0.547			0.546	1.748	99.177	3
4		H/1	0.211	H/2	0.205	H/3	0.202			0.206	2.225	492.48	4
5		A/4	0.000	A/5	0.000	A/6	0.000			0.000	0.000	ausserh.	5
6		B/4	0.000	B/5	0.000	B/6	0.000			0.000	0.000	ausserh.	6
7		C/4	0.000	C/5	0.000	C/6	0.000			0.000	0.000	ausserh.	7
8		D/4	0.000	D/5	0.000	D/6	0.000			0.000	0.000	ausserh.	8
9		E/4	0.000	E/5	0.001	E/6	0.000			0.000	173.205	ausserh.	9
10		F/4	0.000	F/5	0.001	F/6	0.000			0.000	173.205	ausserh.	10
11		G/4	0.001	G/5	0.001	G/6	0.000			0.001	86.603	ausserh.	11
12		H/4	0.001	H/5	0.001	H/6	0.000			0.001	86.603	ausserh.	12
13		A/7	0.000	A/8	0.000	A/9	0.000			0.000	0.000	ausserh.	13
14		B/7	0.000	B/8	0.000	B/9	0.000			0.000	0.000	ausserh.	14
15		C/7	0.000	C/8	0.000	C/9	0.000			0.000	0.000	ausserh.	15
16		D/7	0.000	D/8	0.000	D/9	0.000			0.000	0.000	ausserh.	16
17		E/7	0.000	E/8	0.000	E/9	0.000			0.000	0.000	ausserh.	17
18		F/7	0.000	F/8	0.000	F/9	0.000			0.000	0.000	ausserh.	18
19		G/7	0.000	G/8	0.000	G/9	0.000			0.000	0.000	ausserh.	19
20		H/7	0.000	H/8	0.000	H/9	0.000			0.000	0.000	ausserh.	20
21		A/10	0.000	A/11	0.000	A/12	0.011			0.004	173.205	ausserh.	21
22		B/10	0.000	B/11	0.000	B/12	0.001			0.000	173.205	ausserh.	22
23		C/10	0.000	C/11	0.000	C/12	0.001			0.000	173.205	ausserh.	23
24		D/10	0.000	D/11	0.000	D/12	0.001			0.000	173.205	ausserh.	24
25		E/10	0.000	E/11	0.000	E/12	0.001			0.000	173.205	ausserh.	25
26		F/10	0.001	F/11	0.000	F/12	0.001			0.001	86.603	ausserh.	26
27		G/10	0.000	G/11	0.000	G/12	0.001			0.000	173.205	ausserh.	27
28		H/10	0.000	H/11	0.000	H/12	0.001			0.000	173.205	ausserh.	28

All: Protokoll für die Versuchsdurchführung

**Versuchsprotokoll Enzymimmunoassays**

Bezeichnung: \_\_\_\_\_ Hersteller: \_\_\_\_\_

Charge: \_\_\_\_\_ durchgeführt von/ am: \_\_\_\_\_

Startzeit \_\_\_\_\_ Uhr

---

25 µl Kalibrator? ja

nein

---

100 µl Konjugat ja  Konjugatcharge: \_\_\_\_\_

nein

Zeitpunkt: \_\_\_\_\_ Uhr

---

30 Min Warten? ja

nein

Zeitpunkt: \_\_\_\_\_ Uhr

---

Waschen? Anzahl Waschgänge: \_\_\_\_\_

---

100 µl Substratlösung? ja

nein

Zeitpunkt: \_\_\_\_\_ Uhr

---

30 Min Warten? ja

nein

Zeitpunkt: \_\_\_\_\_ Uhr

---

100 µl Stopplösung? ja

nein

---

OD für 0 ng/ml \_\_\_\_\_ <3,0? Ja?

Nein, weil: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Erstellt am: 13.05.13                      Erstellt von: VPE                      Genehmigt:



### Versuchsprotokoll Enzymimmunoassays

Kommentar:

---

Reproduzierbarkeit:

---

Sensitivität & Spezifität

---

Plausibilitätskontrolle:

---

Fehlermöglichkeiten:

---

Fazit:

---

Beurteilung:

Datum:

Erstellt am: 13.05.13

Erstellt von: VPE

Genehmigt:

## AIII: Gebrauchsanleitung von MAHSAN Diagnostika zu Inspec-EIAs



MAHSAN Diagnostika Vertriebsgesellschaft mbH

Dieselstraße 6  
D-21465 ReinbekTelefon: (040) 72 73 78-0  
Fax: (040) 72 73 78-31E-Mail: info@mahsan.de  
Internet: www.mahsan.de

## Inspec® II-Drogen-EIAs zum Nachweis von Drogen und Medikamenten in Vollblut, Serum und Plasma

### GEBRAUCHSANLEITUNG

Diese Gebrauchsanleitung gilt für folgende Produkte:

Inspec II-AMP-EIA	Kat.-Nr. 1103EC
Inspec II-BAR-EIA	Kat.-Nr. 1108EC
Inspec II-BZO-EIA	Kat.-Nr. 1110EC
Inspec II-BUP-EIA	Kat.-Nr. 1300UC
Inspec II-COC-EIA	Kat.-Nr. 1122EC
Inspec II-COT-EIA	Kat.-Nr. 1124EC
Inspec II-LSA-EIA	Kat.-Nr. 1139UI
Inspec II-MET-EIA	Kat.-Nr. 1104EC
Inspec II-D,L-MTD-EIA	Kat.-Nr. 1142EC
Inspec II-D-MTD-EIA	Kat.-Nr. 1143EC
Inspec II-OPI-EIA	Kat.-Nr. 1150EG
Inspec II-TCA-EIA	Kat.-Nr. 1186EI
Inspec II-THC-EIA	Kat.-Nr. 1118EC

### INHALT

- Vorsichtsmaßnahmen
- Lagerung und Haltbarkeit
- Hinweise zu den Proben
- Gelieferte Testbestandteile
- Erforderlicher Kalibrator- und Reagenzien-Satz
- Notwendige, aber nicht gelieferte Testbestandteile
- Testvorbereitung
- Kurzanleitung für die Inspec II-Drogen-EIAs
- Testdurchführung
- Auswertung
- Grafische Darstellung der Testdurchführung

### VORSICHTSMASSNAHMEN

- Eine Kontamination der Reagenzien, der Gebrauch von ungeeigneten Instrumenten oder die Nichtbeachtung der Gebrauchsanleitung können zu nicht korrekten Ergebnissen führen.
- Der Umgang mit Nahrungsmitteln oder Getränken während der Testdurchführung ist nicht erlaubt.
- Um eine Kontamination der Reagenzien und des Probenmaterials zu vermeiden, sollten immer saubere Gefäße und neue Pipettenspitzen benutzt werden.
- Nicht mit dem Mund pipettieren, da Proben infektiöse Erreger enthalten können. Deshalb sollten beim Umgang und bei der Entsorgung der Proben und der benutzten Testkomponenten und Laborgläser die Regeln der „Guten Laborpraxis“ beachtet werden.
- **Fügen Sie kein Natriumazid zu dem Probenmaterial.**
- Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Verwenden Sie nur gepaarte Mikroplatten und Enzymkonjugat mit der gleichen Charge.
- Die Reagenzien dürfen nicht gefroren werden.
- **Vorsicht, ätzend!** Die Stopplösung enthält Schwefelsäure!

Die Kalibratoren enthalten menschliches Serum, das von drogenfreien, HBV- und HIV-negativen Spendern erhalten wurde. Dennoch können die Kalibratoren infektiös sein und sollten mit entsprechender Vorsicht behandelt werden.

### LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Alle Reagenzien müssen bei +2°C bis +8°C gelagert werden (auch nach Anbruch). Bei sorgfältigem Umgang sind die Reagenzien bis zum Ver-

fallsdatum einsetzbar. Ungenutzte Vertiefungen werden sofort in die wiederverschließbare Alu-Schutzhülle zurückgelegt. Vor Gebrauch und Öffnung der Testkomponenten müssen die Reagenzien Raumtemperatur (+20°C bis +27°C) erreicht haben.

### HINWEISE ZU DEN PROBEN

Falls die Proben nicht sofort analysiert werden, können sie entweder mehrere Tage im Kühlschrank oder für längere Zeit bei -18°C gelagert werden.

Bei einem positiven Ergebnis muss das Resultat mit einer forensisch anerkannten, sensitiveren Methode, wie z.B. GC/MS oder HPLC, bestätigt werden.

### GELIEFERTE TESTBESTANDTEILE

Eine Mikroplatte inkl. einer Flasche Enzymkonjugat.

### ERFORDERLICHER KALIBRATOR- UND REAGENZIEN-SATZ: (BITTE SEPARAT BESTELLEN)

Inspec II-AMP-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1103KAL
Inspec II-BAR-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1108KAL
Inspec II-BZO-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1110KAL
Inspec II-BUP-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1300KAL
Inspec II-COC-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1122KAL
Inspec II-COT-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1124KAL
Inspec II-MET-Kalibrator-Satz,	Kat.-Nr. 1104KAL
Inspec II-D,L-MTD-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1142KAL
Inspec II-D-MTD-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1143KAL
Inspec II-OPI-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1150KAL
Inspec II-TCA-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1186KAL
Inspec II-THC-Kalibrator-Satz	Kat.-Nr. 1118KAL
<b>Inspec II-Reagenzien-Satz</b>	<b>Kat.-Nr. 1199REA</b>

### NOTWENDIGE, ABER NICHT GELIEFERTE TESTBESTANDTEILE

Eine 100 µL-8-Kanalpipette oder Multipipette, eine 25 µL-Einzelpipette, allgemeine Laborgläser, einen Reader (450 und 620 nm) und ein Waschgerät.

### TESTVORBEREITUNG

Der Waschpuffer (WASH BUFFER [c], 30x CONCENTRATE) wird im Verhältnis 1:30 (v/v) mit destilliertem Wasser verdünnt; 50 mL des Konzentrats werden mit destilliertem Wasser auf 1500 mL aufgefüllt. Dann wird der verdünnte Waschpuffer (Waschpuffergebrauchslösung) im Test eingesetzt (Testdurchführung Punkt 5.). Der verdünnte Waschpuffer muss bei +2°C bis +8°C zwischengelagert werden.

### KURZANLEITUNG FÜR DIE INSPEC II-DROGEN-EIAs

Waschpuffer	1:30 (v/v)
Kalibratoren, Proben	25 µL pro Vertiefung unverdünnt, ggf. 1:5 (v/v) verdünnen
Enzymkonjugat (ENZYME CONJUGATE [b])	100 µL pro Vertiefung Inkubation 30 Min. bei Raumtemperatur
Waschen (Waschpuffergebrauchslösung)	6 mal füllen und entleeren; anschließend ausklopfen
Substratlösung (SUBSTRATE SOLUTION [d])	100 µL pro Vertiefung 30 Min. bei Raumtemperatur
Stopplösung (STOPPING SOLUTION [e])	100 µL pro Vertiefung messen Sie die OD bei 450/620 nm

MAHSAN Diagnostika Vertriebsgesellschaft mbH

Dieselstraße 6  
D-21465 ReinbekTelefon: (040) 72 73 78-0  
Fax: (040) 72 73 78-31E-Mail: info@mahsan.de  
Internet: www.mahsan.de

### TESTDURCHFÜHRUNG

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften (z. B. Verklumpung) der Blutproben und der veröffentlichten Untersuchungen von Spiehler et al. in JATOX ist eine Vorverdünnung anzuraten:

- Die Proben und Kalibratoren werden 1:5 (v/v, z.B. 50 µL Serum plus 200 µL Wasser) verdünnt, gut durchmischt oder ggf. homogenisiert und zentrifugiert. 25 µL des Überstands werden im Inspec II-Drogen-EIA untersucht.

Genaue Aufzistung und Beschreibung der Testkomponenten siehe Etikett der Packung.  
Alle Reagenzien und Proben sollten vor Testbeginn Raumtemperatur erreicht haben (+20°C bis +27°C)

- Die **Mikroplatte** (Etikett: „Substanzname [a] 12x8 wells“) wird aus der **wiederverschließbaren** Alu-Schutzhülle (an der Seite aufschneiden) herausgenommen. Sie besteht aus einem Rahmen (waagrecht numerisch und senkrecht alphabetisch markiert) mit 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen; die Vertiefungen kann man einzeln abbrechen und in den Rahmen stecken. Kalibratoren und Proben werden in Einzel- oder ggf. in Doppelbestimmungen eingesetzt. Die nicht verwendeten Vertiefungen und Streifen werden sofort in die Alu-Schutzhülle zurückgelegt.
- Geben Sie **25 µL der 4 Kalibratoren** (beachten Sie auf dem Etikett der Flasche die Angaben in ng/mL) und der Proben in jede Vertiefung. Obwohl es Ermessenssache des Anwenders ist, empfehlen wir alle Kalibratoren und Proben zweifach zu testen. Der Einsatz der Kalibratoren ist bei jedem neuen Testansatz erforderlich.
- Geben Sie **100 µL des Enzymkonjugats** (Etikett: „ENZYM CONJUGATE [b]“) mit einer Pipette in jede Vertiefung.
- Die Mikroplatte wird **30 Min.** bei Raumtemperatur (+20°C bis +27°C) inkubiert.
- Die Platte wird sechsmal mit ca. 350 µL **Waschpuffergebräuchlösung** gewaschen, entweder per Hand oder mit einem Waschgerät. Es ist wichtig zu beachten, dass die Vertiefungen zwischen den Waschschrritten restlos entleert bzw. die Restmenge an Wasser auf einem saugfähigen Tuch „ausgeklopft“ werden.
- Pipettieren Sie **100 µL Substratlösung** (Etikett: „SUBSTRATE SOLUTION [d]“) in jede Vertiefung.

- Inkubieren Sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur (+20°C bis +27°C, die Lösung färbt sich blau) in einem dunklen Behälter.
- Die enzymatische Reaktion wird mit **100 µL Stopplösung** (Etikett: „STOP SOLUTION [e]“) pro Vertiefung gestoppt (die Farbe schlägt von blau auf gelb um).
- Die **OD (optische Dichte)** wird mit einem **Reader** gemessen, Wellenlänge zum Messen: 450 nm und als Referenz: 620 nm. Die ODs müssen sofort gemessen werden, da die OD mit der Zeit abfällt.

### AUSWERTUNG

#### Negatives Ergebnis:

Jede Probe mit einer OD über und einer Konzentration unter dem Cutoff-Kalibrator gilt als negativ.

#### Positives Ergebnis:

Jede Probe mit einer OD unter und einer Konzentration über dem Cutoff-Kalibrator gilt als positiv.

#### Die Präzision der Ergebnisse hängt von folgenden Faktoren ab:

Vom genauem Pipettieren der Kalibratoren und Proben, sorgfältigen Waschen der Vertiefungen, der Verhinderung von Verschleppung des Enzymkonjugats und von kalibrierten und optimal gewarteten Instrumenten. Ein negatives Ergebnis bedeutet nur, dass entweder die gesuchte Substanz nicht vorhanden ist oder die Konzentration der Substanz unterhalb des Cutoffs liegt. Proben mit einer OD unterhalb oder gleich dem Cutoff gelten als vorläufig positiv und müssen durch eine forensisch anerkannte Methode, z.B. GC/MS oder HPLC, bestätigt werden.

Falls möglich, sollten eigene, unabhängige Kontrollen eingesetzt werden. Wenn eigene Kontrollen verwendet werden, dürfen sie nicht Natriumazid enthalten.

Für weitere Fachinformationen, wie z.B. Kreuzreaktivitäten, fordern Sie bitte unseren Katalog für Inspec-Drogen-EIAs unter der Telefonnummer 0800 - 72 73 78-0 an.

### GRAFISCHE DARSTELLUNG DER TESTDURCHFÜHRUNG

