



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Prozessvalidierung des Tecan Infinite Luminometers und Etablierung der Messprotokolle für die IBL Steroid Saliva Lumineszenzassays

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie
zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science

vorgelegt von

Natalie Scharnweber
Matrikelnummer 2052044

Hamburg am 16.12.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä (HAW)
2. Gutachter: Dr. Jörg Spangenberg (IBL International)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt in der Abteilung Qualitätskontrolle der Firma IBL International GmbH in Hamburg.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 16.12.2015

Natalie Scharnweber

Danksagung

Mein Dank an dieser Stelle gilt der Firma IBL International GmbH für die Ermöglichung dieser Bachelorarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen beiden Betreuern Herrn Professor Jörg Andrä sowie Herrn Dr. Jörg Spangenberg für ihre Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit sowie für ihre Geduld.

Mein herzlichster Dank gilt außerdem meinem Mann für seine unermüdliche Unterstützung während des gesamten Studiums.

Inhalt

I. Abbildungsverzeichnis.....	7
II. Tabellenverzeichnis.....	8
III. Abkürzungsverzeichnis.....	9
1. Einleitung und Zielsetzung.....	10
2. Theoretische Grundlagen.....	12
2.1. Lumineszenz.....	12
2.2. Luminometer.....	13
2.3. Lumineszenzassays.....	15
2.4. Steroidhormone.....	17
2.5. Immunreaktives Trypsin.....	19
2.6. Prozessvalidierung.....	19
3. Material.....	21
3.1. Geräte.....	21
3.2. Verwendete Testkits.....	22
3.3. Verwendete Software.....	23
3.4. Verbrauchsmaterialien.....	23
4. Methoden.....	24
4.1. Validierungsplan.....	24
4.2. Design-Qualifizierung (DQ).....	24
4.3. Installations-Qualifizierung (IQ).....	25
4.3.1. Softwareinstallation.....	26
4.3.2. Gerätesensitivität.....	27
4.3.3. Absorbenz Genauigkeit.....	28
4.4. Funktions(Operational)-Qualifizierung (OQ).....	28
4.4.1. Messwertübertragung.....	28

4.4.2. Vergleich verschiedener Algorithmen zur Konzentrationsberechnung anhand der Magellan Software	29
4.4.2.1. MikroWin Vier-Parameter-Methode	31
4.4.2.2. MikroWin Lineare Regressions-Methode	31
4.4.2.3. Magellan LogitLog Methode	31
4.4.2.4. Magellan Vier-Parameter Methode	32
4.4.2.5. Magellan Vier-Parameter-Marquardt Methode	32
4.4.2.6. Magellan Fünf-Parameter-Marquardt Methode	32
4.4.2.7. Magellan Cubic Spline Methode	33
4.4.2.8. Magellan Lineare Regression	33
4.4.3. Vergleich der Lumineszenz Messung	34
4.4.3.1. Abarbeitung der Lumineszenzteste	34
4.4.3.2. Lumineszenzmessung mit dem Luminometer	35
4.4.3.3. Übersprechungsverhalten (Cross-talk)	37
4.4.3.4. Intra-Plattenpräzision	38
4.4.3.5. Richtigkeitsansätze	38
4.5. Leistungs(Performance)-Qualifizierung (PQ)	39
5. Ergebnisse	41
5.1. Validierungsplan	41
5.2. Installations-Qualifizierung (IQ)	41
5.2.1. Magellan Installationsprüfung	42
5.2.2. Detektionslimit (Sensitivität)	42
5.2.3. Absorbance Accuracy (Genauigkeit)	43
5.3. Funktions(Operational)-Qualifizierung (OQ)	44
5.3.1. Datenexport	44
5.3.2. Auswertalgorithmen	44
5.3.3. Messung der Lumineszenz: Cross-talk Testung	49
5.3.4. Plattenpräzisionen	53
5.3.5. Differenzierung und Konzentrationsermittlungen	55
5.4. Leistungs(Performance)-Qualifizierung (PQ)	58

6. Diskussion.....	62
7. Zusammenfassung	70
8. Literaturverzeichnis	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des optischen Systems des Infinite M200 PRO.....	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung des kompetitiven und nicht-kompetitiven Testprinzipes.	16
Abbildung 3: Typische Standardkurven eines kompetitiven und eines Sandwich-Assay.....	17
Abbildung 4: Grundstruktur von Steroidhormonen.....	18
Abbildung 5: Pipettierschema für den Sensitivitätstest.....	27
Abbildung 6: Pipettierschema für Cross-talk Testung.....	37
Abbildung 7: Pipettierschema für die Lumineszenzassays, beispielhaft für den DHEA Test.	39
Abbildung 8: Auszug des Messergebnis- Ausdruckes, Magellan Software.....	44
Abbildung 9: In Excel exportierte Messdaten.....	44
Abbildung 10: Auswertung des Platten-CVs am Beispiel von Estradiol, Std. A, gemessen mit dem Infinite Luminometer, 200ms Integrationszeit und automatischer Filter-abschwächung.	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellerangaben von CentroLIA und Infinite.	41
Tabelle 2: Relativ-light-units (RLU) Ergebnistabelle des ATP Testes für das Infinite M200 Pro Luminometer ohne Filterabschwächung	43
Tabelle 3: Relativ-light-units (RLU) Ergebnistabelle des ATP Testes für das Infinite M200 Pro Luminometer mit automatischer Filterabschwächung.....	43
Tabelle 4: Relativ-light-units (RLU) Ergebnistabelle des ATP Testes für das Centro LIA Luminometer mit automatischer Filterabschwächung.....	43
Tabelle 5: Vergleichende Darstellung der Konzentrationen.....	46
Tabelle 6: Zusammenfassung der Abweichungen der Standardkurvenanalysen zur Referenzmethode in %.....	48
Tabelle 7: CentroLIA Messung, 200ms.....	49
Tabelle 8: Infinite Messung, 200ms, keine Filterabschwächung.	50
Tabelle 9: Infinite Messung, 200ms, automatische Filterabschwächung.....	50
Tabelle 10: Infinite Messung, 100ms, automatische Filterabschwächung.....	51
Tabelle 11: Infinite Messung, 400ms, automatische Filterabschwächung.....	51
Tabelle 12: Zusammenstellung der RLU's und Differenzierungen der Standardkurven der verschiedenen Messungen.	52
Tabelle 13: Zusammenstellung der Ergebnisse der Intra-Plattenpräzision	54
Tabelle 14: Vergleich der RLU-Abweichungen zwischen den Standardkurven am Anfang und am Ende der MTP für Referenz- und Testgerät.....	55
Tabelle 15: Mittelwerte der Abweichungen zum Zielwert der gemessenen Konzentrationswerte für Kitkontrollen und QC-Proben, Standardkurve am Anfang.	56
Tabelle 16: Mittelwerte der Abweichungen zum Zielwert der gemessenen Konzentrationswerte für Kitkontrollen und QC-Proben, Standardkurve am Ende.	56
Tabelle 17: Korrelationsergebnisse für beide Geräte.	57
Tabelle 18: Abweichungen von RLU/RLU_{max} in Prozent zwischen den beiden Geräten.....	57
Tabelle 19: Mittelwerte der Gesamtabweichungen zum Mittelwert für die jeweiligen Bereiche der gemessenen Konzentrationswerte für Kitkontrollen und QC-Proben.	59
Tabelle 20: Abweichungen von RLU/RLU_{max} in Prozent zwischen den beiden Geräten.	60
Tabelle 21: Korrelationsergebnisse für beide Geräte	61
Tabelle 22: statistische Daten.	64
Tabelle 23: Sensitivitäten verschiedener Luminometer, unterschieden in flash und glow Lumineszenz.	68

Abkürzungsverzeichnis

μL	Mikroliter
μmol	Mikromol
amol	Attomol
ATP	Adenosintriphosphat
C	Kohlenstoff
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CV	Coefficient of Variation
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DQ	Design-Qualifizierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FDA	Food and Drug Administration
fmol	Femtomol
GHTF	Global Harmonization Task Force
GMP	Good Manufacturing Practice
IMDRF	International Medical Device Regulators Forum
IPC	In-Prozess-Kontrolle
IQ	Installations-Qualifizierung
IRT	immunreaktives Trypsin
L	Liter
LED	light-emitting diode
LIA	Lumineszenzimmunoassay
mL	Milliliter
ms	Millisekunde
MTP	Mikrotiterplatte
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OQ	Funktions- (Operational)-Qualifizierung
PMT	photomultiplier tube
PQ	Performance- (Leistungs)-Performance
QC	Qualitätskontrolle
RIA	Radioimmunoassay
RLU	relative light units
rpm	rounds per minute
s	Sekunde

1. Einleitung und Zielsetzung

Die vorliegende Bachelorarbeit stellt im Folgenden die Prozessvalidierung eines Messgerätes für Lumineszenz vor. Diese wurde in Zusammenarbeit mit der Firma IBL International GmbH in Hamburg durchgeführt.

Mit Hilfe eines Luminometers können Mikrotiterplatten gemessen werden, in denen ein Chemilumineszenz-Immunoassay durchgeführt wird. Diese Arten von Immunoassays werden genutzt, um zum Beispiel den Gehalt verschiedener Steroidhormone wie Testosteron, Progesteron, Cortisol u.a. im Saliva zu bestimmen. Dies findet Anwendung in der Stressbestimmung, bei Befindlichkeitsstörungen und Zyklusbeschwerden der Frau. Eine weitere Anwendung eines Chemilumineszenz-Immunoassays ist die Bestimmung von immunreaktivem Trypsin bei Neugeborenen im Screening Verfahren mit Blutfilterkarten. Anhand der Konzentration des immunreaktiven Trypsins kann frühzeitig eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Krankheit zystische Fibrose, auch bekannt als Mukoviszidose, vorliegt.

Die Firma IBL International GmbH entwickelt, produziert und vertreibt diverse Immunoassays für den internationalen Medizinproduktmarkt, u. a. beinhaltet das Portfolio der Firma 16 verschiedene Chemilumineszenz-Immunoassays.

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit soll gezeigt werden, dass das Mikrotiterplatten-Luminometer Infinite M200 PRO (Tecan GmbH) unter Verwendung der Magellan Software (Tecan GmbH) für die Messung der IBL-Lumineszenz-Teste geeignet ist. Die mit dem Infinite Luminometer ermittelten Messdaten werden mit denen des CentroLIA-Mikrotiterplatten-Luminometers (Berthold Technologies) verglichen, das bisher als Standardgerät bei der Firma IBL Verwendung findet. Perspektivisch soll das Infinite-Luminometer das CentroLIA-Gerät ersetzen und für alle IBL-Lumineszenz-Teste eingesetzt werden, da das Infinite Gerät neben dem Gebrauch als „Stand-Alone Gerät“ auch in automatisierten Systemen der Firma Tecan einsetzbar ist. Weiterhin ist das Gerät dafür ausgelegt, auch für die Detektion von Fluoreszenz sowie zur Absorptionsmessung eingesetzt werden zu können. Ebenso besteht die Möglichkeit, das Gerät mit weiteren Ausstattungsmerkmalen wie Injektor Systemen oder einer Temperaturkontrollereinrichtung zu versehen.

Im Zuge der Validierung soll zudem untersucht werden, ob Messdateien für die Lumineszenz-Immunoassays zum Nachweis von Steroidhormonen (Cortisol, Progesteron, Testosteron, Estradiol, Dehydroepiandrosteron) im Saliva sowie zum

1. Einleitung und Zielsetzung

Nachweis von neonatalem immunreaktivem Trypsin (IRT) in Vollblut erstellt werden können. Darüber hinaus wird überprüft, ob für kritische Testparameter vergleichbare Ergebnisse zu der Referenzauswertung mit der Software Mikrowin (Mikrotek) erzielt werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Lumineszenz

Der Begriff Lumineszenz wurde zum ersten Mal im Jahre 1888 durch Eilhard Wiedemann eingeführt. Er stammt aus dem Lateinischen und bedeutet „kaltes Leuchten“. (1) Es handelt sich hierbei um die Aussendung von Licht. Lumineszenz liegt vor, wenn die durch Elektronensprung entstehende Energie als Strahlung in einer niedrigeren Frequenz abgegeben wird. Dies erfolgt, wenn die Elektronen von dem angeregten Niveau in ein daruntergelegenes Zwischenniveau übergehen. (3)

Da bei diesen Vorgängen keine Wärme entsteht, wird auch von kaltem Licht gesprochen. Je nach Art der Anregung wird differenziert, ob es sich zum Beispiel um Photolumineszenz handelt, bei welcher die Anregung durch elektromagnetische Strahlung erfolgt, oder um die durch chemische Reaktionen ausgelöste Chemilumineszenz.

Die verschiedenen Arten der Lumineszenz lassen sich anhand der Leuchtdauer nach Ende der Erregung in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterscheiden. Bei Fluoreszenz klingt das entstandene Licht meist in weniger als einer millionstel Sekunde ab, während das Licht bei Phosphoreszenz ein Nachleuchten von mindestens einer tausendstel Sekunde im Anschluss an die Erregung aufweist. (2)

Handelt es sich bei Chemilumineszenz um Vorgänge in biologischen Systemen, wird diese Art der Lumineszenz Biolumineszenz genannt. Bekannt ist diese unter anderem als Leuchten von Glühwürmchen. Die Aussendung von Chemilumineszenz kann durch zwei verschiedene Reaktionen hervorgerufen werden: durch einen einfachen Elektronentransferprozess, bei dem radikale Ionenpaare entstehen oder durch eine Energieübertragung durch Singulett-Sauerstoff. Zu den am häufigsten verwendeten Luminophoren bei Chemilumineszenzreaktionen gehören Derivate von Luminol, Isoluminol oder Acridin. (4)

2.2. Luminometer

Der Begriff „Luminometer“ findet seit 1968 Verwendung (1).

Ein Luminometer ist ein Gerät zur Messung der Lichtausbeute. Hierbei erfolgt die Integration der Kurve, die sich aus dem Auftragen von Lichtemission aufgrund einer chemischen Reaktion gegen eine Zeitspanne ergibt. Luminometer beinhalten eine Probenkammer, die je nach Beschaffenheit des Gerätes für ein Probenröhrchen, eine Mikrotiterplatte oder ein anderes beliebiges Probengefäß geeignet ist. Weitere Bestandteile eines Luminometers sind ein Detektor, eine Technik zur Signalverarbeitung sowie eine Anzeige für das Ausgangssignal. (2)

Die Messung von Licht beruht bei den meisten Detektoren auf der Überführung von Photonen in ein elektrisches Signal. Am Gebräuchlichsten sowie am preisgünstigsten für den Einsatz als Detektor sind Photomultiplier-Röhren (kurz PMT, photomultiplier tube). Ein Photomultiplier enthält eine Vakuumröhre. In dieser sind eine Photokathode, ein Elektronenvervielfacher sowie eine Anode enthalten. An der Photokathode findet der sogenannte photoelektrische Effekt statt. Dabei handelt es sich um die Elektronenablösung aus einem einzelnen Atom oder einem Atomverband. Die Ursache für diesen Vorgang begründet sich in der Einwirkung von elektromagnetischer Strahlung. Die spektrale Empfindlichkeit des Photomultipliers ist abhängig von der Beschaffenheit der gewählten Photokathode. (3)

Lichtemissionskinetik wird unterschieden in blitzartig („flash“), bei der das Licht innerhalb weniger Sekunden ausgesendet wird und glühend („glow“), bei der der Lichtaustritt für eine längere Zeitspanne vorhält. (3)

Die Signalverarbeitung bei Luminometern erfolgt entweder im Photonenzählbetrieb („photon-counting“) oder im Strommessmodus („current-measuring“). Beim Photonenzählbetrieb werden die einzelnen Photonen mit der Photomultiplier-Röhre gezählt. Im Strommessmodus wird der elektrische Strom gemessen, welcher dadurch entsteht, dass Photonen auf die Photomultiplier-Röhre treffen. (2)

Die in dieser Arbeit zum Einsatz kommende photon-counting Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität sowie gute Langzeitstabilität aus. Die wichtigsten zu beachtenden Faktoren bei der Wahl einer Photomultiplier-Röhre sind Spektralempfindlichkeit, Verstärkung sowie der dynamische Bereich. Die Wahl der Spektralempfindlichkeit ergibt sich aus dem verwendeten Chemilumineszenz-System. Die Lichtemission von beispielsweise Acridinium Ester oder Luminol liegt bei einer

2. Theoretische Grundlagen

Wellenlänge von etwa 430 nm (blau), wohingegen Glühwürmchen ein grün-gelbes Licht von etwa 530 nm aussenden.

Die durch das Luminometer erhaltenen Messdaten werden als „relative light units“ (RLU) dargestellt. Diese Werte sind von Gerät zu Gerät unterschiedlich. Bei Nutzung der photon-counting Methode können auch Photonen pro Sekunde als Einheit angegeben werden. (3)

In der vorliegenden Arbeit wird das multifunktionelle Mikrotiterplatten-Lesegerät „Infinite M200 PRO“ von der Firma Tecan Austria GmbH als Luminometer verwendet. Dies wird für die Messung von 96-well Mikrotiterplatten validiert. Als Referenzgerät erfolgt der Einsatz des Luminometers „Centro LIA LB961“ des Herstellers Berthold Technologies. Die Auswahl erfolgt aufgrund des vergleichbaren Aufbaus der Geräte. Bei beiden Luminometern wird die Photonenzählmethode angewendet. In Abbildung 1 ist das optische System des Infinite M200 PRO schematisch dargestellt.

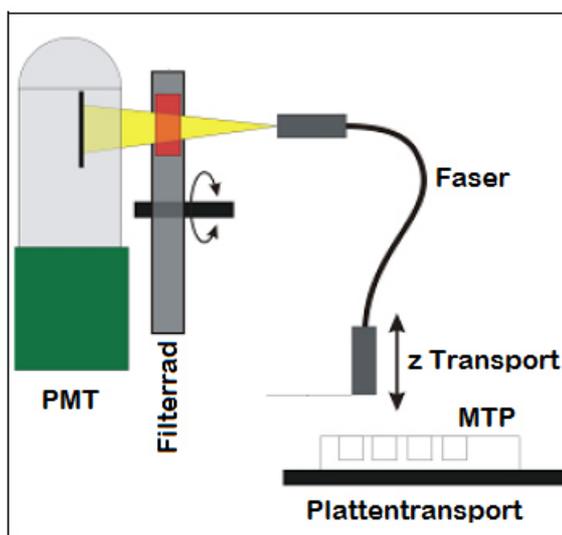


Abbildung 1: Schematische Darstellung des optischen Systems des Infinite M200 PRO.

(entnommen aus (4)). Das von der Probe emittierte Licht wird von einem Faserbündel zur Detektionseinheit geleitet. Hierbei durchläuft das Licht ein Filterrad. Mit Hilfe des von der Gerätesoftware automatisch gesteuerten Z-Transportes erfolgt eine Justierung entsprechend der gewählten Mikrotiterplattendefinition.

2.3. Lumineszenzassays

Unter Verwendung eines Immunoassays kann die Konzentration eines gewünschten Analyten in einer komplexen biologischen Matrix wie zum Beispiel Serum, Plasma, Urin oder Saliva bestimmt werden. Verbreitet sind sogenannte Radioimmunoassays (RIA), Enzyme-linked-immunosorbent-assays (ELISA) und Lumineszenzimmunoassays (LIA). (5)

Die ersten Lumineszenzimmunoassays wurden in den späten 1970er Jahren entwickelt und konnten sich als sichere Alternative zu den seit 1957 bestehenden Radioimmunoassays etablieren. Beide Verfahren sind durch eine hohe Sensitivität gegenüber sehr kleinen, schwer nachzuweisenden Analytkonzentrationen charakterisiert. (6)

Bei Immuntesten wird in kompetitive und in nicht-kompetitive unterschieden. Nicht-kompetitive werden weiterhin in direkte und indirekte unterteilt. Das Nachweisprinzip beruht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen, durch die eine hohe Selektivität gegenüber dem zu bestimmenden Parameter gegeben ist.

Der kompetitive Assay beruht auf einer Konkurrenz zwischen markiertem und unmarkiertem Antigen um eine Antigenbindungsstelle. Wenn die Konzentration der freien Bindungsstellen, also die Konzentrationen an Antikörper und markiertem Antigen, sowie das Flüssigkeitsvolumen konstant ist, kann die Menge an vorliegendem unmarkiertem Antigen in der Lösung bestimmt werden. Je mehr unmarkiertes Antigen in der Probe vorliegt, umso mehr markiertes Antigen wird von den Bindungsstellen verdrängt. Eine hohe Konzentration an unmarkiertem Antigen führt zu einem schwachen Markersignal. Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung dieses Prinzips ist eine Limitierung der freien Bindungsstellen.

Bei dem nicht-kompetitiven Assay, auch als Sandwich-Assay bezeichnet, ist das Antigen von zwei Antikörpern umgeben. Ein sogenannter Fängerantikörper wird an eine Festphase gekoppelt. Dieser dient dazu, Antigen in der Probe spezifisch zu binden. In einem Waschschrift werden weitere, ungebundene Substanzen aus der Probe entfernt. Der Fängerantikörper muss hierzu im Überschuss vorliegen. Als nächster Antikörper kommt ein mit einem Marker ausgestatteter Detektionsantikörper zum Einsatz, welcher bevorzugt monoklonal sein sollte und ebenfalls spezifisch für das Antigen ist. Monoklonale Antikörper werden mittels einer Zelllinie produziert und zeichnen sich durch Spezifität gegen ein einzelnes Epitop aus. Fänger- und Detektionsantikörper

2. Theoretische Grundlagen

sollten an verschiedene Epitope des Antigens binden. In Abbildung 2 sind die Testprinzipie kompetitiv und nicht-kompetitiv schematisch gezeigt.

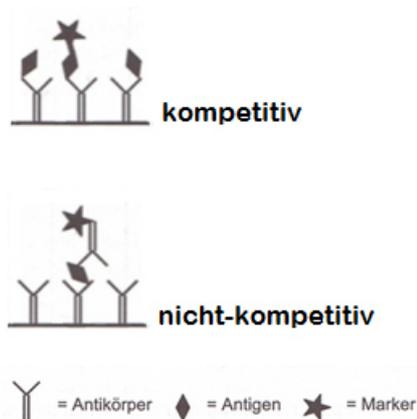


Abbildung 2: Schematische Darstellung des kompetitiven und nicht-kompetitiven Testprinzips.

(modifiziert nach (7)). Bei der kompetitiven Assayvariante ist ein Antikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Das Antigen aus der Probe und enzymmarkiertes Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen am Antikörper. Beim Sandwich-Assay wird das Antigen von einem an der Mikrotiterplatte haftenden Antikörper und einem markierten Fängerantikörper umschlossen.

Bei dem Markerenzym handelt es sich um eine Peroxidase. Nach Zugabe von Lumineszenzsubstrat wie Luminol oder Acridinium-Ester wirkt die Peroxidase als Katalysator für die Chemilumineszenzreaktion. (8, 9)

Beim direkten Assay ist der spezifische Antikörper direkt mit Enzym markiert, beim indirekten Assay wird ein Anti-Antikörper eingesetzt, welcher gegen den spezifischen Antikörper gerichtet ist. Hierdurch wird eine Signalverstärkung erreicht. Pro gebundenem primären Antikörper können mehrere markierte Sekundärantikörper binden.

Die durch die Lumineszenzmessung erhaltenen Rohdaten (RLU) werden gegen die Konzentration einer mitgeführten Standardreihe bekannter Analytkonzentration semilogarithmisch aufgetragen. Aus der entstehenden Kalibrierkurve können unbekannte Konzentrationen entsprechend dem Signalwert abgelesen werden. Abbildung 3 zeigt typische Standardkurven. (5)

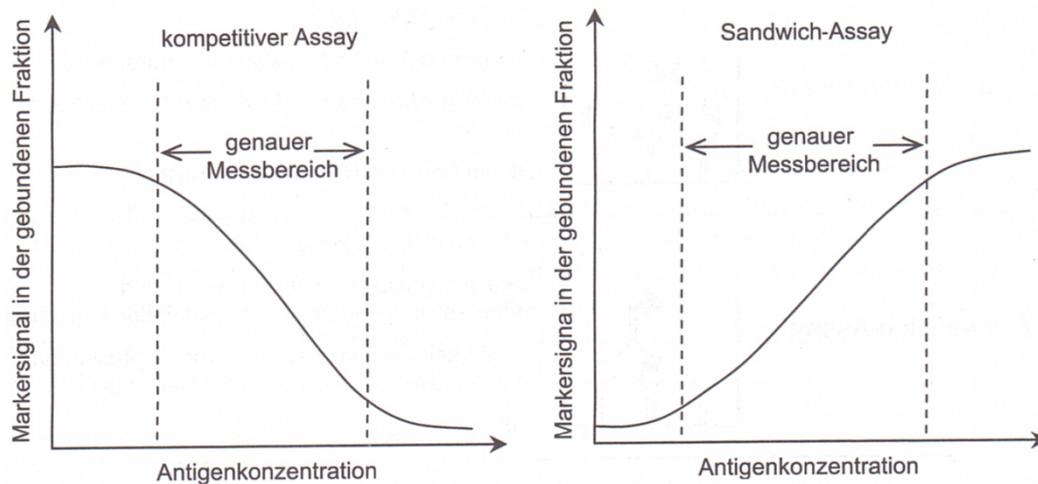


Abbildung 3: Typische Standardkurven eines kompetitiven und eines Sandwich-Assay.

(entnommen aus (7)). Die linke Kurve zeigt eine typische Standardkurve eines kompetitiven Testes. Je höher die Antigenkonzentration ist, umso kleiner ist das erhaltene Markersignal. Auf der rechten Seite ist die charakteristische Standardkurve eines nicht-kompetitiven Assays gezeigt. Das Messsignal verhält sich direkt proportional zur Antigenkonzentration. Der genaue Messbereich befindet sich jeweils im linearen Bereich der Kurve.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Durchführung der Validierung eines Luminometers. Hierbei werden Lumineszenzimmunoassays zum Nachweis einiger Steroidhormone in humanem Saliva sowie zur Bestimmung von immunreaktivem Trypsin in Trockenblutproben von Neugeborenen betrachtet.

2.4. Steroidhormone

Im Vergleich zur bewährten Massenspektrometrie sowie unterschiedlichen Chromatographiemethoden (Gas-, Hochdruckflüssig- und Flüssigchromatographie) stellen Immunoassays eine kostengünstige, einfache und empfindliche Nachweisaltemative für Steroidhormone in der klinischen Diagnostik dar. Als Nachteil der Immunoassays gilt eine mögliche Kreuzreaktivität. (10, 11)

Alle Steroidhormone stammen vom Cholesterol ab. Die Synthese dieser Steroidhormone erfolgt in der Nebennierenrinde, in den Gonaden sowie in der Plazenta. Die Bildung erfolgt jeweils in den Mitochondrien und dem glatten Endoplasmatischen Retikulum. Steroidhormone sind lipophil. In Abbildung 4 ist die Grundstruktur der Steroidhormone gezeigt. (11)

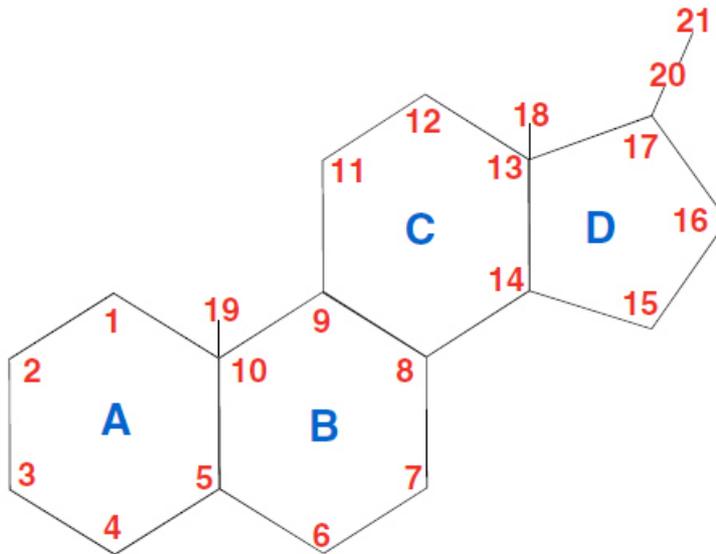


Abbildung 4: Grundstruktur von Steroidhormonen.

Entnommen aus (12). Das Steroidhormon-Grundgerüst besteht aus drei C6-Ringen (A–C) und einem C5-Ring (D) sowie einer Seitenkette. Die Zahlen 1 bis 21 entsprechen der Nummerierung der Kohlenstoffatome.

Steroidhormone sind in Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten nicht löslich. Sie liegen größtenteils an Transportproteinen gebunden vor. Nur ein kleiner Anteil liegt ungebunden vor und ist biologisch aktiv. Diese freien Steroidhormone können im Saliva nachgewiesen werden.

Steroidhormone werden in die Kategorien Mineralcorticoide, Glucocorticoide, Androgene, Östrogene und Gestagene unterteilt. Mineralcorticoide beeinflussen den Elektrolythaushalt des Menschen. Das am häufigsten vorkommende Steroidhormon in der Gruppe der Mineralcorticoide ist Aldosteron. Glucocorticoide sind an der Energieversorgung des Organismus beteiligt und regulieren unter anderem Stress. Bekannt aus dieser Gruppe ist das Cortisol. Androgene sind die männlichen Keimdrüsenhormone mit dem wichtigsten Vertreter Testosteron. Auch das Dehydroepiandrosteron (DHEA) gehört zu dieser Gruppe. Bei den Östrogenen handelt es sich um weibliche Geschlechtshormone mit Vertretern wie Estradiol und Estron. Gestagene sind die Gelbkörperhormone wie das Progesteron. Sie werden auch Schwangerschaftshormone genannt. (11, 13)

Der Vorteil in der Saliva-Diagnostik von Steroidhormonen liegt in der einfachen und schmerzfreien Probennahme, die der Patient selbstständig und flexibel durchführen kann. Für eine Gesamtdiagnostik sollten jeweils auch die Korrelationen der

Konzentration des zu bestimmenden Parameters in Serum oder Plasma herangezogen werden. (13)

In der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Sachverhalt Tests zum Nachweis von Cortisol, DHEA, 17beta-Estradiol, Progesteron sowie Testosteron im Saliva verwendet, um die Validierung eines Luminometers durchzuführen.

2.5. Immunreaktives Trypsin

Die Krankheit Zystische Fibrose, besser bekannt unter dem Namen Mukoviszidose, ist die am meisten verbreitete autosomal rezessive Erkrankung. Als Krankheitsursache gilt eine Mutation des Gens CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Immunreaktives Trypsin (IRT) ist eine von der Bauchspeicheldrüse sezernierte Hydrolase. IRT findet als laborchemischer Marker im Rahmen von Neonatal-Screening-Programmen Anwendung. Die Bestimmung des immunreaktiven Trypsins erfolgt meist in Trockenblutproben und wird zur Diagnosestellung der Krankheit Mukoviszidose verwendet. (21)

In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Sachverhalt ein Lumineszenztest zum Nachweis von IRT verwendet, um die Validierung des Luminometers durchzuführen.

2.6. Prozessvalidierung

Ein Qualitätsmanagement-System spezifiziert die Anforderungen an eine Prozessvalidierung, bezogen auf unternehmensspezifische Anforderungen und Umgebungsbedingungen. Die Prozessvalidierung wird sowohl gesetzlich gefordert als auch in Normen und Empfehlungen beschrieben. (14)

Die Notwendigkeit zum Durchführen einer Prozessvalidierung liegt in der Bestätigung, dass der Prozess konstante Ergebnisse mit den vorher spezifizierten Anforderungen liefert. Eine Prozessvalidierung kann zum Beispiel von der amerikanischen Gesundheitsbehörde (Food and Drug Administration, FDA) eingefordert werden, sofern ein Produkt für den amerikanischen Markt Relevanz hat. Ebenso ist eine Prozessvalidierung nötig, wenn die Einhaltung der Qualitätssicherheitsstandards „Gute Herstellungspraxis“ (Good Manufacturing Practice, GMP) gefordert ist.

2. Theoretische Grundlagen

In der FDA Richtlinie 21 CFR Part 820 Section 820.3 (z)(1) wird die Prozessvalidierung im Englischen definiert als „establishing by objective evidence that a process consistently produces a result or product meeting its predetermined specifications“ (15). Es handelt sich bei einer Prozessvalidierung also um einen objektiven Nachweis, dass ein Prozess beständig zu den gleichen Ergebnissen führt bzw. ein Produkt seine vordefinierten Spezifikationen erfüllt. (16) Die sinngemäß gleiche Definition für eine Prozessvalidierung erfolgt von der Europäischen Kommission sowie der Global Harmonisation Task Force (GHTF). Hierbei handelt es sich um eine bis 2012 agierenden, freiwilligen, internationalen Vereinigung von Vertretern aus Gesundheitsbehörden und der Medizinprodukteindustrie. Die GHTF wurde ersetzt durch das International Medical Device Regulators Forum (IMDRF). (14)

Der Ablauf einer Prozessvalidierung gliedert sich in die nachfolgenden Abschnitte:

- 1) Erstellung eines Validierungsplanes
- 2) Durchführen einer Design-Qualifizierung (DQ)
- 3) Durchführen einer Installations-Qualifizierung (IQ)
- 4) Durchführen einer Funktions-Qualifizierung (Operational Qualification, OQ)
- 5) Durchführen einer Leistungs-Qualifizierung (Performance Qualification, PQ)
- 6) Erstellung eines Abschlussberichtes

Während der Prozessvalidierung sollten ebenso Risikobetrachtungen erfolgen. Risiken, die bei der Durchführung der Prozessvalidierung erkannt werden, sollten weiter beurteilt werden. (14, 17)

3. Material

3.1. Geräte

Bezeichnung	Gerätename	Hersteller	Seriennummer
Luminometer (Testgerät)	Infinite M200 PRO	Tecan Austria	1502000870
Luminometer (Referenzgerät)	Centro LIA LB961	Berthold Technologies	2156
Handdispenser	Multipette plus	Eppendorf	2015857
Mikropipette, Einsatzbereich 10-100µL	Rotilabo Proline	Roth	CT62910
Mikropipette, Einsatzbereich 50-200µL	Rotilabo Proline	Roth	AS14890
Mikropipette, Einsatzbereich, 100-1000µL	Eppendorf Research	Eppendorf	469443
Mikrotiterschüttler	IKA MTS4	IKA Werke	00.215928
8-Kanal Mikroplatten Dispenser (Waschkamm)	Statmatic 1	TriContinent	70893PL
Kurzzeitmesser	Rotilabo Signal- Timer	Roth	-
Kalibrierplatte für Infinite	MultiCheck-Plus	Tecan Austria	605000005
Kalibrierplatte für CentroLIA	QC Test Platte	Berthold Technologies	1034
Trockenblutproben- Stanze für 3mm Spots	Stanzgerät	Sauer-Labtech	11020404

3.2. *Verwendete Testkits*

Testname	Katalognummer	Hersteller	Chargennummer	Verfalldatum
Cortisol Lumineszenztest	RE62011	IBL International	LCO280	31.01.2016
			LCO283	31.08.2016
Cortisol Lumineszenztest	RE62111	IBL International	LCL122	31.08.2016
DHEA Lumineszenztest	RE62051	IBL International	LDH133	31.05.2016
			LDH134	31.10.2016
Estradiol Lumineszenztest	RE62049	IBL International	LES153	28.02.2016
	RE62041		LES154	31.12.2015
Estradiol Lumineszenztest	RE62149	IBL International	LEL112	31.01.2017
	RE62141		LEL113	31.01.2017
Progesteron Lumineszenztest	RE62021	IBL International	LPR141	31.03.2016
			LPR142	31.10.2016
Testosteron Lumineszenztest	RE62031	IBL International	LTE171	30.04.2015
			LTE175	30.06.2016
	RE62039		LTE177	31.01.2017
IRT Lumineszenztest	RE68019	IBL International	LIT137	30.11.2015
			LIT142	31.05.2016
			LIT145	31.08.2016
ATP Kit SL	144-041	Bio Thema AB	191124	28.02.2016

3.3. Verwendete Software

Bezeichnung	Name	Hersteller	Versionsnummer
Steuerungs- und Auswertesoftware	Magellan (Standardversion)	Tecan Austria	Version 7.2
Steuerungs- und Auswertesoftware	MikroWin2000	Mikrotek	Version 4.41
Tabellenkalkulationsprogramm	Excel 2010	Microsoft	2010

3.4. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer	Chargennummer
Pipettenspitzen, 2-200 µL	Sarstedt	70.760.002	0005/4217001
Pipettenspitzen, 50-1250 µL	Sarstedt	70.1186.100	Y23081
10 mL Glasflaschen mit Deckel	Nipro Glass Germany	ZVDIN58378-AR10-FL1	142254014
20 mL Glasflaschen mit Deckel	Müller + Müller	ZVDIN5838-AR20-FL1	81003003-121-01
Dispenserspitzen, 2.5 mL (Combitips advanced)	Eppendorf	0030089448	E161401L
Dispenserspitzen, 5 mL (Combitips advanced)	Eppendorf	0030089456	E160864/L
Dispenserspitzen, 10 mL (Combitips advanced)	Eppendorf	0030089464	D1580200
Papierhandtücher	Tork	OL-1721541	-

4. Methoden

4.1. Validierungsplan

Vor Beginn der Prozessvalidierung wird ein Plan über die durchzuführende Prozessvalidierung erstellt. Entsprechend den Vorgaben des Qualitätsmanagement-Systems der Firma IBL erfolgen hierzu die Identifizierung aller verwendeten Geräte und Geräteparameter sowie erforderlicher Dokumente. Zudem erfolgen die Durchführung einer Betrachtung von Extremwerten in Form von Prozessgrenzen und Bewertung aller Prozessschritte sowie die Definition der Akzeptanzkriterien.

Die Erstellung des Plans und die damit verbundene Durchführung der Prozessvalidierung erfolgt in Anlehnung an die Richtlinien zur Prozessvalidierung von der Global Harmonization Task Force. (18)

Der Plan muss vor Beginn der Validierung durch Verantwortliche der Produktentwicklung, Qualitätskontrolle sowie Produktion und vom Qualitätsmanagement-Beauftragten freigegeben werden. Anhand eines spezifischen Qualitätsmanagement-Formblattes werden alle Schritte der Prozessvalidierung dokumentiert.

Das Infinite Luminometer wird im Vergleich zum CentroLIA Luminometer von Berthold Technologies getestet. Das Infinite Gerät wird mit der Software Magellan von Tecan verwendet, für das Vergleichsgerät wird die Software MikroWin der Firma Mikrotek benutzt. Die Validierung erfolgt prospektiv bei der auch retrospektive Daten verwendet werden und gliedert sich in die Phasen Installations-Qualifizierung (IQ), Funktions(Operational)-Qualifizierung (OQ) sowie Leistungs(Performance)-Qualifizierung (PQ).

4.2. Design-Qualifizierung (DQ)

Innerhalb einer Design-Qualifizierung muss überprüft werden, ob das zu validierende Instrument für den vorgesehenen Verwendungszweck geeignet ist. (28) Für das zu validierende Gerät ist eine Design-Qualifizierung (DQ) bereits vom Hersteller des Infinite Luminometers durchgeführt worden, das Gerät wird serienmäßig hergestellt und es ist laut Gebrauchsanweisung für den bestimmten Zweck vorgesehen. Somit entfällt im Rahmen dieser Prozessvalidierung die DQ. (5)

4.3. Installations-Qualifizierung (IQ)

Während der Installations-Qualifizierung soll überprüft werden, ob das Gerät den Herstellerangaben entsprechend funktioniert. Es soll in dieser Phase sichergestellt werden, dass zum einen alle zugehörigen Komponenten richtig eingerichtet wurden, sowie dass entsprechende Software richtig installiert wurde. (16, 19) Außerdem wird unter Betrachtung der Qualitätskontrollempfehlungen aus dem Betriebshandbuch überprüft, ob geforderte Spezifikationen erfüllt werden. Im Falle der vorliegenden Validierung handelt es sich hierbei um die Überprüfung der Gerätesensitivität sowie um Testung der Absorbenz Genauigkeit. (4)

Für die zu vergleichenden Geräte Infinite als Testgerät und CentroLIA als Referenzgerät werden ähnliche Lager- und Betriebsbedingungen von den jeweiligen Herstellern angegeben (siehe Tabelle 1: Herstellerangaben). Es bestehen keine besonderen Raum- und Umgebungsanforderungen. Beide Geräte werden elektrisch mit Energie versorgt CentroLIA: 220-230V, 50Hz; Infinite: 100-120/220-240V, 50-60Hz Zu dem InfiniteGerät des Herstellers Tecan gibt es eine Konformitätserklärung, welche die Übereinstimmung mit folgenden Richtlinien, Normen und Sicherheitsanforderungen ausweist:

- 2006/95/EG
- 2004/108/EG
- 2006/42/EG
- EN 61010-1:2001
- EN 61010-2-081:2002/A1:2003
- EN 61326-1:2006
- EN ISO 12100:2010

Das Infinite Gerät ist im Labor direkt neben dem CentroLIA Gerät aufgebaut und zur Steuerung und Auswertung an die Magellan-Software angeschlossen. Das Gerät wird serienmäßig für die Messung von Lumineszenz-Testen im 96 Well-Format angeboten. Es wird somit zur Messung der IBL-Lumineszenzassays als geeignet eingestuft. (4)

Die Software Magellan ist ebenso serienmäßig für das Gerät und u.a. für die Erstellung von Messdateien bzw. zur Auswertung von Absorptions/Lumineszenz-basierten Testen einsetzbar. (20) Eine Erstellung der entsprechenden Dateien und die Durchführung von

Berechnungen zur Ermittlung von Konzentrationen ist daher mit der Software durchführbar.

Das Gerät ist serienmäßig mit einem integrierten Filtersystem ausgestattet, um vorkommende zu hohe Lichtintensität abzuschwächen. Dies findet ggf. Anwendung bei Assays mit hoher Lichtausbeute. Der Einfluss der Filterfunktion wird im Rahmen eines „worst-case-Szenarios“ mit Testen hoher Lichtausbeute (Cortisol) und niedriger Ausbeute (Progesteron oder Estradiol) untersucht und im Rahmen der Überprüfungen der Lumineszenzmessungen bewertet. (4)

Nach Herstellerangaben werden die Gerätespezifikationen jedes einzelnen Infinite 200 Pro-Readers im Zuge der Produktion bei Tecan Austria überprüft (=100% Kontrolle) und nur Instrumente, welche die Spezifikationen erfüllen werden ausgeliefert.

Für die Software Magellan wird eine IQ zur Installationsüberprüfung durchgeführt. Das Infinite Luminometer wird zur Überprüfung der Absorbance Accuracy mit einer vom Hersteller Tecan zu beziehenden MultiCheck Platte für das Gerät getestet. Die Sensitivität wird laut Herstellerangaben unter Verwendung des BioThema ATP Kits überprüft.

4.3.1. Softwareinstallation

Während der Installations-Qualifizierungsphase wird überprüft, ob die Installation der Magellan Software erfolgreich war. Hierzu wird ein zur Software gehörendes Installationsprüfprogramm verwendet. Das Programm führt automatisch Testungen zur Überprüfung des Status aller aktuellen Komponenten durch und gibt diesen anschließend in Form eines Reports aus. Es wird empfohlen, diese Überprüfung nach jeder Neuinstallation durchzuführen. (20) Nach Anwählen der Datei „MagellanIQ.exe“ wird automatisch eine Prüfung der Installation durchgeführt und anschließend ein Installation Qualifikations- Report generiert.

4.3.2. Gerätesensitivität

Um auch geringe Analytkonzentrationen nachweisen zu können sollte ein Luminometer eine möglichst geringe Sensitivität/ Detektionslimit aufweisen. Um die Sensitivität des Infinite Luminometers zu bestimmen wird der ATP Kit SL (BioThema Ab) verwendet. Die Durchführung erfolgt entsprechend den Vorgaben der Infinite Betriebsanleitung sowie der Gebrauchsanweisung für den ATP Kit SL.

In Abbildung 5 ist das Pipettierschema, analog zur Mikrotiterplatte, für die Testung dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	Bx (leer)	ATP 1/500	Bx (leer)	B	B	B	B	B	B	B
B	Bx (leer)	ATP 1/500	Bx (leer)	B	B	B	B	B	B	B
C	Bx (leer)	ATP 1/500	Bx (leer)	B	B	B	B	B	B	B
D	Bx (leer)	ATP 1/500	Bx (leer)	B	B	B	B	B	B	B

Abbildung 5: Pipettierschema für den Sensitivitätstest.

Dargestellt ist die Pipettieraufteilung des ATP Tests. Die Abbildung stellt schematisch eine Mikrotiterplatte dar. In den mit Bx gekennzeichneten wells ist kein Inhalt enthalten. Den mit ATP 1/500 bezeichneten wells wurde der ATP Standard in einer 1:500 Verdünnung mit der Endkonzentration = $2 \cdot 10^{-8}$ mol ATP zugegeben. Die mit B bezeichneten wells enthalten einen Mix aus ATP Reagenz und Tris-EDTA Puffer im Verhältnis 1:5.

Zur Bestimmung des Detektionslimit wird eine ATP-Standardflasche mit Diluent C gelöst. Der Standard mit der Konzentration von $10 \mu\text{mol/L}$ wird 1:100 in Tris-EDTA-Puffer vorverdünnt indem $10 \mu\text{L}$ ATP-Standard mit $9990 \mu\text{L}$ Tris-EDTA Puffer in einer Glasflasche gemischt werden. Der vorverdünnte Standard wird direkt innerhalb der Vertiefungen der zu verwendenden weißen Greiner 96-well Mikrotiterplatte nochmals 1:5 verdünnt indem $40 \mu\text{L}$ des vorverdünnten Standards mit $160 \mu\text{L}$ ATP-Reagenz vermischt werden. Diese Mischung ist im Schema mit ATP 1/500 bezeichnet. Die Vertiefungen mit der Beschriftung Bx (leer) enthalten nichts, in den Wells mit der Bezeichnung B wurden jeweils $200 \mu\text{L}$ einer 1:5 Verdünnung von ATP Reagenz mit Tris-EDTA Puffer gegeben. 3mL ATP Reagenz wurden hierfür mit 12mL Tris-EDTA Puffer in einer Glasflasche vermischt.

Die Lumineszenzmessung wird mit dem Infinite mit einer Integrationszeit von 1s einmal mit und einmal ohne aktivierte automatische Filterabschwächung durchgeführt. Zum Vergleich wird die Mikrotiterplatte auch im CentroLIA Luminometer mit einer Integrationszeit von 1 s gemessen. Das verwendete CentroLIA Gerät ist standardmäßig mit einem Abschwächungsfilter versehen, welcher bei jeder Messung aktiv ist. Die Lumineszenzmessung erfolgte zum Vergleich nacheinander von einer einzigen

Mikrotiterplatte. Die Messdaten beider Geräte wurden ausgedruckt und zur weiteren Verarbeitung in Excel exportiert. (4, 21)

4.3.3. Absorbenz Genauigkeit

Zur Überprüfung der Genauigkeit der Absorbenz des Infinite Luminometers wird nach dem vom Hersteller vorgeschriebenen Testverfahren vorgegangen. Es handelt sich hierbei um die Testung mit einer Kalibrierplatte (MultiCheck-Plus Platte) und dazugehöriger Testsoftware.

Nach Installation der Überprüfungssoftware muss zunächst der sogenannte Normfile der Platte geladen werden, dies geschieht unter File/update/Normfile. Hierzu ist dann die Datei mit der Endung .xml auszuwählen. Der Test kann dann durch Drücken der „Play“ Taste gestartet werden. Das Programm fordert den Anwender auf, die MultiCheck Platte in das Gerät zu setzen und die auf der Platte installierten LEDs durch Drücken eines Knopfes zu aktivieren. Nach Aktivierung leuchten die LEDs permanent für die Dauer von 5 Minuten. Die MultiCheck Platte ist mit einer Batterie versehen. Diese wird bei der jährlich durchzuführenden Kalibrierung der Platte durch den Hersteller getauscht, die enthaltene Kapazität reicht aus, um mindestens einmal wöchentlich eine Testung durchzuführen. Nach Abschluss der Testung kann ein Report ausgedruckt werden. Dieser enthält die Ergebnisse der Überprüfung mit Bewertung. (22)

4.4. Funktions(Operational)-Qualifizierung (OQ)

Die Funktionsqualifizierung dient der Überprüfung, ob das Messgerät den gewünschten Anforderungen entspricht. In dieser Phase werden kritische Punkte überprüft und eine Risikobewertung durchgeführt. (17)

4.4.1. Messwertübertragung

Um die Funktion des Datenexport von der Magellan Software in eine Excel-Tabellenkalkulationsdatei zu verifizieren wird eine Messung eines IBL-Lumineszenztestes (96 Messwerte) mit dem Infinite Gerät und der Magellan-Software durchgeführt. Die Daten werden mit der Datenexportfunktion der Software Magellan in Excel kopiert. Es wird ein Vergleich der Daten durchgeführt. Hierbei wird eine Messung mit dem Infinite Gerät und der Magellan Software durchgeführt und das Ergebnis ausgedruckt. Die Datenexportfunktion wird genutzt, die erhaltenen Messdaten werden in ein leeres Excel-Tabellenblatt exportiert und dieses Blatt wird ausgedruckt. Bei beiden Ausdrucken werden die Daten durch vergleichende Betrachtung hinsichtlich

einer exakten Übereinstimmung geprüft. Der entsprechende Messwert auf dem Ausdruck der Magellan Software muss mit dem in Excel exportierten Wert übereinstimmen, Abweichungen sind nicht zulässig.

4.4.2. Vergleich verschiedener Algorithmen zur Konzentrationsberechnung anhand der Magellan Software

Innerhalb der Validierung sollen für die nachfolgend aufgeführten Teste Messdateien unter Verwendung der Software Magellan erstellt werden. Die Ergebnisse hieraus werden hinsichtlich kritischer Testparameter zu der Referenzauswertung mit MikroWin verglichen. Die in dieser Arbeit verwendeten Lumineszenzassays, wie nachfolgend aufgelistet, sind mit Luminol- oder Acridin-basierten Substraten ausgestattet.

- 1.) RE62011/ RE62111_Cortisol Lumineszenzassay
- 2.) RE62021_Progesteron Lumineszenzassay
- 3.) RE62031_Testosteron Lumineszenzassay
- 4.) RE62041/RE62141_Estradiol Lumineszenzassay
- 5.) RE62051_DHEA Lumineszenzassay
- 6.) RE68015-19_IRT neonatal Lumineszenzassay

Da das Infinite Luminometer durch die Magellan-Software und das CentroLIA durch die MikroWin-Software gesteuert wird, muss eine vergleichende Auswertung der Messergebnisse durchgeführt werden, um einen möglichen Einfluss durch Unterschiede in der Konzentrationsberechnung berücksichtigen zu können. Hier wird unter Einbeziehung von retrospektiven Daten zunächst ein Vergleich, bezogen auf Auswertalgorithmen zwischen der Referenzsoftware von Mikrowin sowie der Software Magellan, durchgeführt.

Die anschließend durchzuführende prospektive Validierung im Rahmen der Lumineszenzmessung, siehe unter Punkt 4.4.3., erfolgt mit Hilfe der Neuerstellung von testspezifischen Messdateien. Hierzu wird der Einfluss auf die Ergebnisfindung untersucht und bewertet. Außerdem wird durch die Neuerstellung von testspezifischen Messdateien mittels Magellan überprüft, ob diese Software für die Anforderungen der Messaufnahme und Messauswertung für diese spezifischen Teste geeignet ist.

Es werden zunächst die spezifischen, den Vorgaben der MikroWin Software sowie der testspezifischen Arbeitsanleitung entsprechenden Parameterdateien, mittels Magellan Software erstellt und überprüft. Die Programmierung der Messdateien mit Magellan erfolgt unter Berücksichtigung der maßgebenden Kriterien die auch bei der Referenzauswertung mit MikroWin Anwendung finden.

Hierbei werden die Messdaten aus der Freigabe Messung der Qualitätskontrolle für die jeweils gültige Testcharge verwendet. Es wird je ein Lauf für die sechs zu betrachtenden Teste verwendet. Die mit MikroWin generierten Messdaten werden in Magellan kopiert und mit Hilfe der neu erstellten Methoden unter vergleichender Anwendung verschiedener Auswertelgorithmen betrachtet. Die zu untersuchenden Auswertemodalitäten richten sich dabei nach den jeweiligen Vorgaben in den testspezifischen Arbeitsanweisungen.

Die Konzentrationsberechnung, bei den in dieser Arbeit behandelten Immunoassays, erfolgt anhand einer Kalibrierkurve. Eine Anzahl an bekannten Analytkonzentrationen der Standards wird herangezogen um einen Funktionsgraphen zu erstellen. Hierbei werden die bekannten Konzentrationen gegen die Signalintensität, im vorliegenden Fall gegen die relative light units (RLU) als Einheit für die Lumineszenzintensität, aufgetragen. Die Wahl des sogenannten Curve-Fittings, der zur Kurvenerstellung zugrundeliegenden Formel, hat Einfluss auf die Ergebnisgenauigkeit. (23)

Für die Steroidassays kommen die nachfolgend aufgelisteten Varianten zum Einsatz:

- Vier-Parameter-Methode
- Vier-Parameter-Methode Marquardt
- Fünf-Parameter-Methode
- Fünf-Parameter-Methode Marquardt
- LogitLog
- Cubic Spline

Für den IRT-Assay wird an Stelle der LogitLog-Methode die Methode Lineare Regression betrachtet.

Es wird für jeden Kurvenanalysentyp die Abweichung der erhaltenen Konzentrationen zu den Referenzwerten aus der MikroWin Auswertung verglichen.

4.4.2.1. MikroWin Vier-Parameter-Methode

Bei der MikroWin Vier-Parameter-Methode erfolgt eine sigmoidale Kurvenlegung, die optimal an die vorgegebenen Stützstellen angepasst ist. Die zugrundeliegende mathematische Gleichung (1.) lautet:

$$y = d + \frac{a-d}{\left[1+\left(\frac{x}{c}\right)^b\right]} \quad (1.)$$

mit:

a = erhaltener Wert bei minimaler Konzentration

b = Steigung im Wendepunkt

c = Wendepunkt, analog zur mittleren Konzentration

d = erhaltener Wert bei maximaler Konzentration

(23, 24)

4.4.2.2. MikroWin Lineare Regressions-Methode

Bei der linearen Regressions-Methode unter Nutzung der Referenzsoftware MikroWin wird der analytische Zusammenhang zwischen den Messwerten und der Konzentration anhand der folgenden Geradengleichung (2.) ermittelt.

$$y = a_0 + a_1 \cdot x \quad (2.)$$

mit:

a₀ = y-Achsenabschnitt

a₁ = Steigung

(24)

4.4.2.3. Magellan LogitLog Methode

Bei der LogitLog Berechnung mit der Software Magellan wird eine sigmoidale Kurve unter Nutzung von mindestens vier Basispunkten erzeugt. Auf der Asymptote wird ein Minimum und Maximum Limit erreicht. Die LogitLog Methode kann nur dann angewendet werden, wenn die Standarddaten in Relation zur Konzentration einem sigmoiden Prozess entsprechen. Außerdem muss die erstellte Kurve in Bezug zum 50%

Abschnitt symmetrisch sein. Zur richtigen Kurvenberechnung sollten ein Konzentrationswert von null sowie ein maximal hoher Wert an Standardkonzentrationen vorliegen. Sofern diese Werte nicht vorhanden sind, werden diese von der Software Magellan entsprechend dem niedrigsten und höchsten vorliegenden Wert generiert. Die mathematische Formel entspricht der Gleichung (1.). Hierbei werden die vier Stützstellen a bis d zunächst einer Logit-Transformation unterzogen. Anschließend erfolgt die Kurvenapproximation. (20, 24)

4.4.2.4. Magellan Vier-Parameter Methode

Die Methodenberechnung Vier-Parameter mittels der Software Magellan basiert auf der Nelder und Mead Downhill-Simplex Methode. Es gelten die gleichen Voraussetzungen wie bei der LogitLog Methode. Bei der Vier Parameter Berechnung wird eine sigmoidale Kurve erzeugt. Für die Berechnung werden mindestens vier Basispunkte benötigt. Die annähernde Funktion wird durch die Gleichung (1.) beschrieben. Zunächst wird eine LogitLog Annäherung berechnet, dann werden die Parameter A, B, C und D mittels des Downhill-Simplex Algorithmus optimiert. Die Berechnung endet erfolgreich, wenn eine Genauigkeit von 0.001 erreicht wurde oder schlägt fehl, wenn die maximale Anzahl von 10000 Iterationen erreicht wurde ohne dass die geforderte Genauigkeit erreicht wurde. (20)

4.4.2.5. Magellan Vier-Parameter-Marquardt Methode

Die Magellan Methode Vier-Parameter- Marquardt benötigt die gleichen Voraussetzung wie auch die LogitLog Methode. Die erzeugte Kurve wird mittels der Levenberg-Marquardt Methode erzeugt, die mathematische Formel entspricht Gleichung (1.). Hierbei erfolgt eine genauere Annäherung, die Prozessierung nimmt mehr Zeit in Anspruch. Analog zur Vier Parameter Berechnung wird eine sigmoidale Kurve erzeugt und zunächst eine LogitLog Annäherung durchgeführt. Der Algorithmus wird entweder bis zu einer Genauigkeit von 10^{-7} durchgeführt oder abgebrochen, sofern 30000 Iterationen nicht das gewünschte Ergebnis liefern. (20)

4.4.2.6. Magellan Fünf-Parameter-Marquardt Methode

Die Magellan Fünf-Parameter-Marquardt Methode benötigt die gleichen Anforderungen wie die LogitLog Methode, die sigmoidale Kurve kann nicht-symmetrisch sein. Die zu erzeugende Kurve wird anhand des Levenberg-Marquardt Algorithmus erstellt. Mindestens fünf Basis Punkte werden benötigt. Der Algorithmus wird entweder bis zu

einer Genauigkeit von 10^{-7} durchgeführt oder abgebrochen, sofern 30000 Iterationen nicht das gewünschte Ergebnis liefern. Die entsprechende mathematische Formel wird mit Gleichung (3.) angegeben.

$$y = d + \frac{a-d}{\left[1+\left(\frac{x}{c}\right)^b\right]^e} \quad (3.)$$

mit

a bis d: siehe Gleichung (1.)

e: Asymmetrie Faktor

(20)

4.4.2.7. Magellan Cubic Spline Methode

Die für die mit Magellan anwendbare Cubic Spline Berechnung geht auf die Formel (4.) zurück.

$$y = a + bx + cx^2 + dx^3 \quad (4.)$$

Hiermit werden die kubischen Polynome beschrieben, welche die Stützstellen verbinden. Die Parameterermittlung erfolgt anhand der sogenannten Not-a-Knot Bedingung. Es werden mindestens drei Basispunkte für diese Berechnung benötigt.
(20, 25)

4.4.2.8. Magellan Lineare Regression

Die mittels der Magellan Software durchgeführte Berechnung mittels Linearer Regression beruht auf der Summenberechnung der quadratischen Abweichungen der Stützpunkte. Hierbei sind mindestens zwei Stützpunkte erforderlich. Die annähernde Funktion wird durch Gleichung Nummer (5.) beschrieben.

$$x = A \cdot x + B \quad (5.)$$

Die Parameter A und B werden bestimmt durch Minimieren der Fehlerfunktion (6.).

$$err(A, B) = \sum_{i=1}^n (f(x_i) - y_i)^2 \quad (6.)$$

(20)

4.4.3. Vergleich der Lumineszenz Messung

Für das CentroLIA ist eine Filtervorrichtung im Gerät installiert, welche immer Anwendung findet. Für das Infinite Luminometer muss im Messprotokoll in der Magellan Software für jedes Protokoll festgelegt werden, welche Filteroption verwendet werden soll.

Um die Funktionalität der Lumineszenz Messung zu belegen, wurden Untersuchungen durchgeführt. Bei den Untersuchungen handelt es sich um Messungen von Lumineszenzimmunoassays mit dem Referenzluminometer CentroLIA sowie mit dem Testluminometer Infinite. Zunächst wird die Durchführung der Lumineszenzimmunoassays beschrieben, diese erfolgt entsprechend der jeweiligen Arbeitsanleitung für den Test. Im Zuge der Lumineszenzmessung wird zunächst das Übersprechungsverhalten während der Lumineszenzmessung betrachtet, hierzu wird der Test Estradiol verwendet. Danach werden verschiedene Präzisionstestungen mit den Testen Cortisol und Estradiol durchgeführt. Anschließend werden die Teste Cortisol, DHEA, Estradiol, IRT, Progesteron und Testosteron unter Verwendung der enthaltenen Standardreihe, den Kitkontrollen sowie einem jeweiligen Set Qualitätskontrollproben durchgeführt. Bei den verwendeten Lumineszenztesten handelt es sich um Glow-Lumineszenzteste. Bei allen Testungen wird bezüglich der Pipettierung des Lumineszenzreagenz wie folgt verfahren:

Das Lumineszenzreagenz wird zeilenweise mäanderförmig aufgegeben, da dies der Messrichtung des Infinite Luminometers entspricht. Die Messrichtung beim CentroLIA wird soweit wie möglich angeglichen, die CentroLIA Messung erfolgt Zeile für Zeile.

4.4.3.1. Abarbeitung der Lumineszenzteste

Die verwendeten Assays werden entsprechend der jeweiligen Arbeitsanleitung durchgeführt. Vor Gebrauch werden jeweils alle benötigten Komponenten auf Raumtemperatur gebracht sowie durchmischt.

Für die Teste DHEA, Estradiol, Progesteron und Testosteron liegt jeweils das gleiche Abarbeitungsschema vor. Es werden pro entsprechender Kavität der Mikrotiterplatte 50 μ L (20 μ L bei Progesteron) der Standards, Kitkontrollen sowie Qualitätskontrollproben pipettiert. Mit Assaypuffer im Verhältnis 1:101 verdünntes Enzymkonjugat wird im Volumen von 50 μ L pro well hinzugegeben, ebenso wie 50 μ L gebrauchsfertiges Antiserum je well. Die Mikrotiterplatte wird mit einer Folie zugeklebt. Auf einem Orbitalschüttler erfolgt eine vierstündige Inkubation bei ca. 500

rpm und Raumtemperatur. Anschließend wird jedes well viermal mit einem zuvor mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnten Waschpuffer unter Verwendung eines Mehrkanal-Mikroplatten Dispensers gewaschen und die enthaltene Flüssigkeit jeweils verworfen. Nach dem Waschen wird die Mikrotiterplatte auf Filterpapier ausgeklopft. Jedem well werden 50 μ L (100 μ L bei DHEA) gebrauchsfertige Chemilumineszenzreagenzlösung zugegeben. Eine zehnminütige Inkubation wird beim Zugeben des Substrates in das erste well gestartet. Die Pipettierrichtung entspricht der Messrichtung des zu beurteilenden Luminometers, zeilenweise mäanderförmig. Nach Ablauf der zehn Minuten erfolgt die Lumineszenzmessung.

Beim Cortisol werden 50 μ L (RE62011) bzw. 20 μ L (RE62111) Standard, Kitkontrolle und Qualitätskontrollprobe zu jedem well gegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 μ L gebrauchsfertigem Enzymkonjugat je well. Nach einer dreistündigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgen vier Waschzyklen. Pro well werden 50 μ L einer im Verhältnis 1:2 gemischten Lösung aus zwei Chemilumineszenzreagentien pipettiert und wie bei den anderen Testen nach zehnminütiger Inkubation gemessen. Für den IRT Test werden je Kavität ein entsprechender Trockenblutspot (Durchmesser 3mm) von Standards, Kitkontrollen und Qualitätskontrollproben mit einer Stanze in jedes well gegeben. Zu jedem well werden 150 μ L von mit Assaypuffer im Verhältnis 1:321 verdünntes Enzymkonjugat gegeben. Die Mikrotiterplatte wird mit schwarzer Folie beklebt. Der Test wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei ca. 500 rpm inkubiert. Die Mikrotiterplatte wird nach Ablauf der Inkubation mit einem Mehrkanal-Mikroplatten Dispensers und Verwendung eines zuvor mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnten Waschpuffer gewaschen. Die Flüssigkeit wird entsprechend verworfen. Dieser Waschzyklus wird insgesamt fünfmal durchgeführt. Anschließend wird die Mikrotiterplatte auf Filterpapier trockengeklopft. Zu jedem well werden 50 μ L gebrauchsfertiges Chemilumineszenzreagenz hinzugegeben. Die Platte wird mit einer schwarzen Folie abgedeckt und inkubiert für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei ca. 500 rpm. Nach diesem Schritt erfolgt die Lumineszenzmessung.

4.4.3.2. Lumineszenzmessung mit dem Luminometer

Die beiden zu vergleichenden Luminometer werden mindestens 15 Minuten vor Start der Messung eingeschaltet, dies ist notwendig, damit alle Gerätekomponenten auf Betriebstemperatur sind. (4)

Für das Referenzgerät CentroLIA wird nach dem im Labor etablierten Verfahren vorgegangen. Hierbei wird das Gerät mit der Software MikroWin2000 gesteuert und die Daten ausgewertet. Für die Lumineszenzteste bestehen standardisierte Messprotokolle, auch Parameterfiles genannt. Es werden bei allen Messungen die voreingestellten Definitionen für die geometrische Beschaffenheit der Platte verwendet, diese muss einmalig je Plattentyp konfiguriert werden. Die Lumineszenzmessung erfolgt Spalte für Spalte jeweils von oben nach unten. Für alle Steroidassays beträgt die Integrationszeit pro well 200 Millisekunden. Bevor die Messung startet, ist eine Messverzögerung von 30 Sekunden eingestellt. Hierbei inkubiert die zu messende Platte im Dunkeln. Dies soll dazu dienen, mögliche Störeffekte, auf welche das CentroLIA Luminometer empfindlich reagiert, zu minimieren. Dies wird nur speziell für das Referenzgerät durchgeführt. Bei den Konzentrationsermittlungen wird jeweils die Curve-Fitting Methode Vier Parameter verwendet. Für den IRT Test erfolgt die Lumineszenzmessung ohne Messverzögerung bei einer Integrierzeit von 100 Millisekunden pro well. Eine Kurvenberechnung erfolgt anhand der Vier Parameter Methode.

Bei den Messungen wird im Allgemeinen so vorgegangen, dass für die jeweilige Mikrotiterplatte (96 well Format) eines Lumineszenzassays nacheinander auf beiden Luminometern die Lumineszenzmessung durchgeführt wird. Die beiden Geräte stehen direkt nebeneinander, sodass die gleichen Umgebungsbedingungen bestehen und zeitliche Verzögerungen der Messung vernachlässigbar sind. Innerhalb eines Zeitfensters von maximal zehn Minuten wurde eine Testmikrotiterplatte auf beiden Messgeräten vermessen. In den Herstellerangaben des verwendeten Chemilumineszenzsubstrates wird eine verlängerte Haltbarkeit des Signals angegeben. Es ist davon auszugehen, dass das jeweilige Lumineszenzsignal für die Zeitspanne von bis zu zehn Minuten stabil ist. (26)

Für alle durchgeführten Testungen wurde in der OQ-Phase immer zuerst auf dem CentroLIA Gerät gemessen und anschließend auf dem Infinite.

Das Testgerät Infinite M200 Pro wird mit der Software Magellan gesteuert und die Datenauswertung vorgenommen. Die Erstellung der Messprotokolle erfolgt zum einen in Anlehnung an die etablierten Versionen der Referenzmethode, zum anderen an die spezifischen Vorgaben der Bedienungsanleitungen für das Infinite Luminometer sowie für die Magellan Software. Ebenfalls werden gewonnene Erkenntnisse aus den

vorhergehenden Arbeitsschritten aus der Sensitivitätstestung für die Messdurchführung herangezogen. Die erhaltenen Resultate aus dem Vergleich der Auswertalgorithmen werden für die Curvefitting Parameter berücksichtigt. Bei der Magellan Software ist eine einmalige Definition jedes Plattentyps notwendig.

4.4.3.3. Übersprechungsverhalten (Cross-talk)

Bei der Anwendung von Mikrotiterplatten mit Glow-Lumineszenztesten und Messung im Luminometer kann ein sogenanntes Übersprechungsverhalten (Cross-talk) auftreten. Hierbei kann durch die Nähe benachbarter wells Licht zwischen den Kavitäten übertreten und das Ergebnis verfälschen. Die Verwendung von weißen Mikrotiterplatten minimiert diesen Effekt. (3)

Die Cross-talk Testung soll zeigen, dass zwischen benachbarten wells der Mikrotiterplatte keine Strahlungsbeeinflussung der RLUs gegenseitig erfolgt. Hierzu wurde eine Austestung mit dem Estradiol Test durchgeführt, der anhand des in Abbildung 6 gezeigten Pipettierschemas durchgeführt wurde.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard A_1				Kitkontrolle 1_2		Standard A_3		Standard G_2			
B	Standard B_1				Kitkontrolle 2_2				Kitkontrolle 1_4			
C	Standard C_1				Standard A_2				Kitkontrolle 2_4			
D	Standard D_1				Kitkontrolle 1_3							
E	Standard E_1											
F	Standard F_1				Kitkontrolle 2_3				Standard D_2		Kit-	
G	Standard G_1								Standard E_2		kontrolle	
H	Kitkontrolle 2_1	Kitkontrolle 1_1			Standard A_4				Standard F_2		2_5	

Abbildung 6: Pipettierschema für Cross-talk Testung.

In der Abbildung ist schematisch eine Mikrotiterplatte dargestellt. Eine Standardreihe wurde in Vierfachbestimmung pipettiert. Die gelb umrahmten Kitkontrollen stellen dar, dass in der Mitte jeweils Kitkontrollen pipettiert werden und diese von Standard A, welcher ein hohes RLU-Messsignal liefert, sowie von Standard G, welcher ein niedriges RLU-Messsignal liefert, umgeben sind.

Die Lumineszenz-Messung der Mikrotiterplatte erfolgte in der Reihenfolge wie nachfolgend aufgelistet:

- 1) Infinite Luminometer, 200ms, keine automatische Filterabschwächung
- 2) CentroLIA Luminometer, Standardprotokoll
- 3) Infinite Luminometer, 200ms, automatische Filterabschwächung
- 4) Infinite Luminometer, 100ms, automatische Filterabschwächung
- 5) Infinite Luminometer, 400ms, automatische Filterabschwächung

Dabei sollen die ermittelten Konzentrationen der gelb umrahmten Kit-Kontrollen darüber Aufschluss geben, wie stark sie sich verändern, wenn sie von Standard A und von Standard G umgeben sind. Die MTP wird pipettiert und in beiden Luminometern, welche im selben Raum nebeneinander unter gleichen Bedingungen stehen, direkt nacheinander in einem Zeitfenster von 1-5 Minuten gemessen. Die eventuell möglichen Einflussfaktoren wie Temperatur, Luftfeuchte können bei der Betrachtung vernachlässigt werden, da sie keine Auswirkung auf die Vergleichbarkeit der Luminometer haben. Bei der Magellan Software wird die Lumineszenzmessung mit einer Integrationszeit von 200 Millisekunden und einer automatischen Filterabschwächung. Die Konzentrationsberechnung erfolgt unter Verwendung der Vier Parameter Marquardt Methode.

4.4.3.4. Intra-Plattenpräzision

Zum Vergleich der Intra-Plattenpräzisionen werden jeweils die Standards A (hoher RLU-Messbereich) und G (niedriger RLU-Messbereich) der Cortisol (50 μ L Probenvolumen) und Estradiolassays (20 und 50 μ L Probenvolumen) eingesetzt. Diese werden in 96-fach Bestimmung auf der ganzen Platte verteilt und die entsprechenden statistischen Parameter wie Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler, Variationskoeffizient ermittelt. Diese werden anschließend zwischen den Geräten verglichen.

Die Messung der Intra-Plattenpräzision erfolgt jeweils zuerst mit dem Infinite Gerät unter Anwendung von automatischer Filterabschwächung und einer Integrationszeit von 200ms. Danach erfolgt die Messung mit dem CentroLIA nach dem Standardprotokoll sowie anschließend erneut mit dem Infinite Gerät bei 200ms Integrationszeit ohne automatische Filterabschwächung.

4.4.3.5. Richtigkeitsansätze

Die Lumineszenzassays für die Bestimmung von Cortisol, DHEA, Estradiol, Progesteron, Testosteron sowie immunreaktiven Trypsin werden auf beiden Geräten gemessen. Die jeweiligen Läufe werden durchgeführt und ausgewertet. Bei jedem Lauf werden die RLU's absolut und bezogen auf den Nullstandard gegenüber gestellt. Es werden die absoluten Abweichungen für die RLU's und die B/Bmax-Werte ausgerechnet. Es werden für jede Spalte Mittelwerte gebildet. Die Messung der Lumineszenz darf nur in den RLU's, nicht aber in der prozentualen Differenzierung

bezogen auf den Nullstandard (B/Bmax) abweichen.

Das Pipettierschema gestaltete sich bei jedem Ansatz folgendermaßen und ist in Abbildung 7 beispielhaft gezeigt: Zu Beginn eine Standardreihe und Kitkontrollen in Doppelbestimmung, Qualitätskontrollproben in Doppelbestimmung, Auffüllen der restlichen freien wells mit Kitkontrollen und Standards und am Ende eine weitere Standardkurve.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std. A	Std. A	K2_2	K2_2	SV6	SV6	K1_3	K1_3	K1_3	K1_3	Std. A	Std. A
B	Std. B	Std. B	K1_1	K1_1	SV7	SV7	K2_3	K2_3	K2_3	K2_3	Std. B	Std. B
C	Std. C	Std. C	K1_2	K1_2	SV8	SV8	K1_4	K1_4	K1_4	K1_4	Std. C	Std. C
D	Std. D	Std. D	SV1	SV1	SV9	SV9	K2_4	K2_4	K2_4	K2_4	Std. D	Std. D
E	Std. E	Std. E	SV2	SV2	SV10	SV10	K1	K1	K2	K2	Std. E	Std. E
F	Std. F	Std. F	SV3	SV3	K1	K1	C	C	C	C	Std. F	Std. F
G	Std. G	Std. G	SV4	SV4	K2	K2	E	E	E	E	Std. G	Std. G
H	K2_1	K2_1	SV5	SV5	K1	K1	C	C	C	C	K2	K2

Abbildung 7: Pipettierschema für die Lumineszenzassays, beispielhaft für den DHEA Test.

In der Abbildung ist schematisch eine Mikrotiterplatte gezeigt. Es wird jeweils am Anfang und am Ende eine Standardreihe pipettiert. Zusätzlich werden Kitkontrollen und die für den jeweiligen Assay verfügbaren Qualitätskontrollproben pipettiert.

Beide Standardkurven wurden hinsichtlich RLUs und Differenzierung betrachtet sowie die Konzentration der Proben anhand beider Standardkurven berechnet. Die Lumineszenzmessung erfolgt zunächst mit dem Infinite Luminometer bei Anwendung von automatischer Filterabschwächung und einer Integrationszeit von 200 ms. Die Konzentrationsberechnung wird mittels der Curvefit Analyse Vier Parameter nach Marquardt durchgeführt. Anschließend wird die entsprechende Mikrotiterplatte im CentroLIA Luminometer unter Verwendung der Standardmethode vermessen. Es werden die absoluten Konzentrationsabweichungen und Abweichungen pro Platte berechnet, die sich aus den Standards am Anfang und am Ende ergeben. Die Ergebnisse werden dann für das Referenz- und Testgerät miteinander verglichen.

4.5. Leistungs(Performance)-Qualifizierung (PQ)

Während der Leistungsqualifizierung soll gezeigt werden, dass das Luminometer unter normalen Nutzungsbedingungen gleichbleibend unter Erfüllung der vorgegebenen Spezifikationen zur Lumineszenzmessung genutzt werden kann. Die bisher erhaltenen Ergebnisse müssen reproduzierbar sein. (27)

Die Leistungsqualifizierung erfolgt durch laufende Routine Ansätze in der Qualitätskontrollabteilung. Hierbei handelt es sich um Freigabeansätze für Chargenendkontrollen oder Stabilitätsüberprüfungen. Bei den Ansätzen werden Kitkontrollen und Qualitätskontrollproben mitgeführt und die erhaltenen Ergebnisse der Messung auf beiden Luminometern verglichen. Hierbei erfolgt die Messreihenfolge wie in der OQ-Phase.

5. Ergebnisse

5.1. Validierungsplan

Der Validierungsplan wurde wie in Punkt 4.1. beschrieben durchgeführt. Die nachfolgend aufgelisteten Kriterien wurden festgelegt: Für den Vergleich der Auswertalgorithmen werden die maximal zulässigen Differenzen der Konzentrationsermittlungen auf $< 5\%$ für den Durchschnitt festgelegt. Die Variationskoeffizienten werden festgelegt auf $< 6\%$, die Abweichungen zwischen den Geräten auf $< 6\%$.

Bei den Richtigkeitsansätzen sollen die B/Bmax-Werte als entscheidendes Kriterium angesehen werden, es wurde festgelegt, dass diese im Mittel pro Assay und pro Lauf nicht mehr als 5% voneinander abweichen dürfen.

Die mittels Excel durchzuführende Korrelationen soll in den folgenden Bereichen liegen:

$$0.8 < m < 1.2 \quad m = \text{Steigung}$$

$$r > 0.9 \quad r = \text{Korrelationskoeffizient}$$

Die Festlegung dieser Kriterien erfolgte unter Heranbeziehung der Qualitätskontrollkriterien der IBL sowie in Anlehnung an (28) sowie (29).

5.2. Installations-Qualifizierung (IQ)

Folgende Angaben der Hersteller für Geräteparameter unterscheiden sich bzw. sind vergleichbar:

Tabelle 1: Herstellerangaben von CentroLIA und Infinite.

Die folgenden Angaben sind den Gerätehandbüchern entnommen.

	<i>CentroLIA LB961 (Berthold Technologies GmbH)</i>	<i>Infinite M200 PRO (Tecan Austria GmbH)</i>
<i>Betriebstemperaturbereich</i>	15-35°C	15-30°C
<i>Feuchtigkeitsbereich</i>	10-85%	< 80%
<i>Detektor</i>	Photomultiplikator, photon counting technology	Photomultiplikator, photon counting technology
<i>Messzeit</i>	0.1-200s	0.1-20s
<i>Übersprechung (Crosstalk)</i>	< 10^{-6}	< 0.01 % (schwarze Platte)
<i>Dynamischer Bereich</i>	> 6 Dekaden	> 6 Dekaden
<i>Software</i>	Eigene Software, MikroWin	i-control, Magellan
<i>Betriebssystem notwendig</i>	MS Windows95, MS EXCEL	MS Windows XP, MS EXCEL
<i>Anschluss</i>	RS232	USB

Das CentroLIA-Gerät wird im Rahmen monatlicher Wartungen unter Verwendung einer Lumineszenz-Testplatte LB 9515 (Berthold Technologies) regelmäßig im monatlichen Intervall zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit analysiert. Während des Validierungszeitraumes durchlief das CentroLIA erfolgreich alle Überprüfungszyklen.

5.2.1. Magellan Installationsprüfung

Die Überprüfung der Magellan Installation wurde wie im dazugehörigen Handbuch beschrieben durchgeführt. Hierbei ist der Status bei allen durchgeführten Testen als gelungen gekennzeichnet.

5.2.2. Detektionslimit (Sensitivität)

Mit Hilfe des ATP Kit SL (Biothema Ab) soll die Sensitivität/das Detektionslimit des Gerätes ermittelt werden. Die Berechnung des Detektionslimits erfolgt anhand von Formel 7.

$$\text{Detektionslimit, } \frac{\text{fmol}}{\text{well}} = \frac{2 \cdot 10^{-8} \cdot 3 \cdot \text{Stdev}_B}{\text{mean}_{ATP} - \text{mean}_B} \cdot 0.0002 \cdot \frac{1}{1e^{-15}} \quad (7.)$$

Mit:

$2 \cdot 10^{-8} =$	Konzentration ATP Std., mol/L
StdevB =	Standardabweichung von blank
mean RLU ATP =	RLU Mittelwert ATP Standard
mean RLU B =	RLU Mittelwert blank wells
0.0002 =	Umwandlung in mol/well
$1/1e^{-15} =$	Umwandlung in fmol/well

Die nachfolgenden Tabellen 2-4 zeigen die erhaltenen Messergebnisse und die daraus berechnete Sensitivität (Detektionslimit).

Die Ergebnisse sind jeweils im Mikrotiterplattenlayout entsprechend dem Pipettierschema (siehe Abbildung 5) angegeben. Auf der rechten Seite der Tabelle sind die unter Heranziehung der Formel (6.) berechneten Werte für die Sensitivität (Det.Limit) in fmol pro well angegeben. Stddev B entspricht der Standardabweichung von blank, mean RLU, ATP gibt den RLU Mittelwert für den ATP Standard an und mean RLU, B gibt den RLU Mittelwert für die blank wells an.

Tabelle 2: Relativ-light-units (RLU) Ergebnistabelle des ATP Testes für das Infinite M200 Pro Luminometer ohne Filterabschwächung .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A	259	360060	274	166	163	161	137	145	139	144	Stdev B: 22.92 mean RLU, ATP: 362770 mean RLU, B: 121 Det. Limit, fmol/well: 0.76	
B	213	361190	197	136	131	123	138	129	128	118		
C	221	363350	180	125	111	98	98	92	102	100		
D	142	366480	127	116	91	96	91	110	109	92		

Tabelle 3: Relativ-light-units (RLU) Ergebnistabelle des ATP Testes für das Infinite M200 Pro Luminometer mit automatischer Filterabschwächung.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A	98	346090	98	48	51	42	62	39	40	49	Stdev B: 8.89 mean RLU, ATP: 345705 mean RLU, B: 45 Det. Limit, fmol/well: 0.31	
B	90	342420	71	50	31	53	49	36	46	59		
C	87	343670	87	63	33	35	36	42	33	47		
D	83	350640	92	49	33	54	42	48	48	53		

Tabelle 4: Relativ-light-units (RLU) Ergebnistabelle des ATP Testes für das Centro LIA Luminometer mit automatischer Filterabschwächung.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A	58	427747	99	50	66	58	58	58	58	83	Stdev B: 16.52 mean RLU, ATP: 424731 mean RLU, B: 51 Det. Limit, fmol/well: 0.47	
B	91	423244	66	41	33	58	33	33	66	58		
C	99	419557	107	74	50	25	41	41	50	58		
D	91	428377	58	33	33	25	41	50	58	91		

Es zeigt sich bei der Sensitivitätstestung, dass bei der automatischen Abschwächung mit Filter beim Infinite Gerät die beste Untergrenze (0.31 fmol/well) für das Detektionslimit im Vergleich zum CentroLIA (0.47 fmol/well) und zum Infinite ohne automatische Filterabschwächung erzielt wird (0.76 fmol/well).

5.2.3. Absorbance Accuracy (Genauigkeit)

Zur Überprüfung der Absorbance Accuracy des Infinite Luminometers wird die von Tecan angebotene MultiCheck Platte verwendet. Die Testung des Luminometers wird mit Verwendung der MultiCheck Software nach Anleitung durchgeführt. Hierbei wurden alle Spezifikationen erfüllt.

5.3. Funktions(Operational)-Qualifizierung (OQ)

5.3.1. Datenexport

Zur Überprüfung der Datenexportfunktion der Software Magellan wurde beispielhaft ein Testansatz Cortisol Saliva RE62111, Charge LCL121, verwendet. Der Test wurde durchgeführt und mit dem Infinite Luminometer und Verwendung der Magellan Software gemessen. Anschließend wurden die Daten mit Hilfe der Export Funktion in Excel exportiert. Jeder Wert aus Excel wurde mit dem Ausdruck der Magellan-Auswertung verglichen. Es wurden keine Abweichungen festgestellt. Nachfolgend sind in Abbildung 8 und 9 ein Auszug des Magellan-Ausdruckes sowie die Excel Werte gezeigt.

2	2	2	2
9.4564e+005	3.4333e+005	3.3046e+006	6.7547e+005
1.058e+006	3.9536e+006	3.2775e+006	2.6568e+005
7.3649e+006	3.9283e+006	2.1247e+006	2.7858e+005
7.2739e+006	4.3081e+006	2.1839e+006	
6.1177e+006	4.2892e+006	2.0336e+006	
6.111e+006	5.6706e+006	1.9539e+006	
5.4321e+006	5.6281e+006	1.2433e+006	
5.6102e+006	4.5952e+006	1.2415e+006	
3.6556e+006	5.1917e+006	6.919e+005	
3.6968e+006	6.228e+006	6.7535e+005	
1.6885e+006	6.1861e+006	3.7446e+005	
1.6929e+006	5.6346e+006	3.744e+005	
9.1307e+005	5.5848e+006	1.0596e+006	
8.7378e+005	3.9888e+006	1.0617e+006	
3.4042e+005	4.526e+006	1.0978e+006	
3.3681e+005	3.4109e+006	1.1107e+006	
1.0577e+006	3.4022e+006	4.0287e+006	
1.0502e+006	1.5384e+006	3.9322e+006	
7.2313e+006	1.5142e+006	4.0954e+006	
7.2665e+006	2.7989e+006	3.9319e+006	
6.2585e+006	2.8357e+006	7.8159e+006	
6.2085e+006	7.0919e+005	7.5818e+006	
5.4774e+006	7.0559e+005	5.9367e+006	
5.4773e+006	5.6826e+006	6.0142e+006	
3.6245e+006	5.6562e+006	5.2166e+006	
3.7178e+006	4.9065e+006	5.236e+006	
1.6511e+006	4.9542e+006	3.2288e+006	
1.706e+006	4.083e+006	3.3378e+006	
8.8612e+005	4.0174e+006	1.3327e+006	
8.6701e+005	3.7373e+006	1.3924e+006	
3.3225e+005	3.8654e+006	6.3173e+005	

Abbildung 8: Auszug des Messergebnis-Ausdruckes, Magellan Software.

9.4564E+05	3.4333E+05	3.3046E+06	6.7547E+05
1.0580E+06	3.9536E+06	3.2775E+06	2.6568E+05
7.3649E+06	3.9283E+06	2.1247E+06	2.7858E+05
7.2739E+06	4.3081E+06	2.1839E+06	
6.1177E+06	4.2892E+06	2.0336E+06	
6.1110E+06	5.6706E+06	1.9539E+06	
5.4321E+06	5.6281E+06	1.2433E+06	
5.6102E+06	4.5952E+06	1.2415E+06	
3.6556E+06	5.1917E+06	6.9190E+05	
3.6968E+06	6.2280E+06	6.7535E+05	
1.6885E+06	6.1861E+06	3.7446E+05	
1.6929E+06	5.6346E+06	3.7440E+05	
9.1307E+05	5.5848E+06	1.0596E+06	
8.7378E+05	3.9888E+06	1.0617E+06	
3.4042E+05	4.5260E+06	1.0978E+06	
3.3681E+05	3.4109E+06	1.1107E+06	
1.0577E+06	3.4022E+06	4.0287E+06	
1.0502E+06	1.5384E+06	3.9322E+06	
7.2313E+06	1.5142E+06	4.0954E+06	
7.2665E+06	2.7989E+06	3.9319E+06	
6.2585E+06	2.8357E+06	7.8159E+06	
6.2085E+06	7.0919E+05	7.5818E+06	
5.4774E+06	7.0559E+05	5.9367E+06	
5.4773E+06	5.6826E+06	6.0142E+06	
3.6245E+06	5.6562E+06	5.2166E+06	
3.7178E+06	4.9065E+06	5.2360E+06	
1.6511E+06	4.9542E+06	3.2288E+06	
1.7060E+06	4.0830E+06	3.3378E+06	
8.8612E+05	4.0174E+06	1.3327E+06	
8.6701E+05	3.7373E+06	1.3924E+06	
3.3225E+05	3.8654E+06	6.3173E+05	

Abbildung 9: In Excel exportierte Messdaten.

5.3.2. Auswertalgorithmen

Zur Überprüfung der Ergebniskalkulation der Konzentration von Magellan unter Verwendung verschiedener Standardkurvenanalysen wurden jeweils retrospektiv Daten der folgenden Testansätze der QC-Abteilung verwendet:

- Cortisol LUM (RE62011): Freigabe-Lauf der Charge LCO282
- Progesteron LUM (RE62021): Freigabe-Lauf der Charge LPR141
- Testosteron LUM (RE62039): Freigabe-Lauf der Charge LTE176
- Estradiol LUM (RE62041): Freigabe-Lauf der Charge LES154
- DHEA LUM (RE62051): Freigabe-Lauf der Charge LDH133
- IRT LUM (RE68019): Freigabe-Lauf der Charge LIT141

Die mit MikroWin und dem CentroLIA gemessenen Daten wurden in die Magellan Auswertemaske hineinkopiert und mit den in Punkt 4.4.2. aufgelisteten Berechnungstypen ausgewertet.

Die Magellan Software verfügt über folgende Fehleroptionen:

Wenn ein Wert der berechneten Konzentration außerhalb der Standardkurvenkonzentration liegt, wird entweder >Max oder <Min ausgegeben. Sofern eine Berechnung dennoch gewünscht ist, kann optional die Funktion Extrapolation gewählt werden. Wenn für die Berechnung der Konzentration eines Wertes mehrere Lösungen existieren, wird MultPt ausgegeben.

Es wurde als Referenz jeweils die etablierte Methode der Auswertung verwendet, die auch bei allen Routine Messungen wie In Prozess-Kontrollen oder Freigabeansätzen zum Einsatz kommt. Für Magellan wurden die Methoden getestet, die theoretisch zum Einsatz kommen könnten um die bestmögliche zu finden.

In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die erhaltenen Konzentrationsergebnisse der verschiedenen Teste und Standardkurventypen für Kontrollen und QC-Proben im Vergleich zur bisherigen Standardmethode mit MikroWin angegeben.

Tabelle 5: Vergleichende Darstellung der Konzentrationen.

Für die Parameter Cortisol, Progesteron, Testosteron, Estradiol, DHEA und IRT wurde retrospektiv eine Auswertung mit der Software Magellan unter Anwendung verschiedener Algorithmen zur Konzentrationsberechnung durchgeführt. Die hieraus erhaltene Konzentration für ein repräsentatives Probenset, bestehend aus Kitkontrollen und Qualitätskontrollproben, wird mit der mittels Referenzalgorithmus determinierten Konzentration verglichen. Als Referenzalgorithmus wurde jeweils die MikroWin 4-Parameter Methode benutzt sowie zusätzlich als Referenzalgorithmus 2 bei dem Parameter IRT die MikroWin Lineare Regression Methode. Zwischen der jeweiligen Magellan- und Referenzkonzentration wird unter Benutzung der Formel (8.):

$$\text{Abweichung} = \left(\frac{\text{MikroWin Konzentration}}{\text{Magellan Konzentration}} \right) - 1 \quad (8.)$$

die Abweichung zwischen beiden Konzentrationswerten in Prozent angegeben.

Cortisol Konzentration, $\mu\text{g dL}^{-1}$:

Probenbezeichnung	Referenzalgorithmus	4 Parameter Methode	Abweichung zur Referenzmethode, %	4 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	5 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	Cubic Spline	Abweichung zur Referenzmethode, %	LogitLog	Abweichung zur Referenzmethode, %
K2	1.218	1.562	-22.0	1.233	-1.2	1.183	3.0	MultiPt	x	1.252	-2.7
K1	0.178	0.170	5.0	0.178	-0.2	0.181	-1.7	0.191	-6.9	0.159	12.0
QCSV1	0.117	0.112	4.3	0.116	0.5	0.118	-1.2	0.121	-3.7	0.107	8.9
QCSV2	0.163	0.155	5.1	0.163	0.1	0.165	-1.5	0.173	-6.0	0.146	11.6
QCSV3	0.123	0.119	3.5	0.124	-0.5	0.126	-2.2	0.129	-4.9	0.113	8.4
QCSV4	0.034	0.034	-1.4	0.033	1.5	0.033	2.7	0.032	7.2	0.035	-2.9
QCSV5	0.075	0.073	3.0	0.074	1.4	0.075	0.2	0.075	-0.6	0.071	5.2
QCSV6	0.219	0.211	4.0	0.222	-1.4	0.224	-2.4	0.238	-8.0	0.195	12.4
QCSV7	0.345	0.337	2.5	0.352	-2.0	0.351	-1.8	0.355	-2.8	0.303	13.7
QCSV8	1.158	1.463	-20.8	1.182	-2.0	1.134	2.1	MultiPt	x	1.180	-1.9
QCSV9	0.732	0.789	-7.2	0.751	-2.5	0.728	0.6	MultiPt	x	0.672	9.0
QCSV10	2.330	> Max	x	2.280	2.2	2.263	3.0	3.967	-41.3	> Max	x

Progesteron Konzentration, pg mL^{-1} :

Probenbezeichnung	Referenzalgorithmus	4 Parameter Methode	Abweichung zur Referenzmethode, %	4 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	5 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	Cubic Spline	Abweichung zur Referenzmethode, %	LogitLog	Abweichung zur Referenzmethode, %
K2	218.66	222.90	-1.9	220.72	-0.9	219.27	-0.3	MultiPt	x	218.47	0.1
K1	50.18	49.83	0.7	50.27	-0.2	50.44	-0.5	50.74	-1.1	46.32	8.3
QCSV1	21.15	20.69	2.2	20.89	1.2	20.88	1.3	21.31	-0.8	20.40	3.7
QCSV2	24.35	23.90	1.9	24.14	0.9	24.16	0.8	25.53	-4.6	23.29	4.5
QCSV3	45.36	45.01	0.8	45.43	-0.2	45.58	-0.5	46.59	-2.6	42.06	7.9
QCSV5	63.20	62.90	0.5	63.38	-0.3	63.57	-0.6	62.18	1.6	57.94	9.1
QCSV6	101.62	102.11	-0.5	102.44	-0.8	102.50	-0.9	101.41	0.2	93.60	8.6
QCSV7	119.77	120.67	-0.7	120.81	-0.9	120.71	-0.8	119.83	-0.1	111.11	7.8
QCSV8	209.33	213.39	-1.9	211.52	-1.0	210.21	-0.4	MultiPt	x	207.55	0.9
QCSV9	556.37	579.50	-4.0	554.40	0.4	550.12	1.1	979.85	-43.2	926.50	-39.9
QCSV1	14.81	14.67	0.9	14.80	0.1	14.74	0.4	13.84	7.0	14.91	-0.6
QCSV2	17.41	17.03	2.3	17.18	1.3	17.15	1.5	16.59	4.9	17.07	2.0
QCSV3	64.85	64.72	0.2	65.20	-0.5	65.39	-0.8	63.81	1.6	59.56	8.9
QCSV4	97.97	98.42	-0.5	98.78	-0.8	98.86	-0.9	97.53	0.5	90.17	8.7
QCSV5	341.01	351.25	-2.9	343.35	-0.7	340.04	0.3	950.65	-64.1	392.43	-13.1
QCSV6	618.49	648.43	-4.6	616.50	0.3	612.83	0.9	984.66	-37.2	> Max	x

5. Ergebnisse

Testosteron Konzentration, pg mL⁻¹:

Probenbezeichnung	Referenzalgorithmus	4 Parameter Methode	Abweichung zur Referenzmethode, %	4 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	5 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	Cubic Spline	Abweichung zur Referenzmethode, %	LogitLog	Abweichung zur Referenzmethode, %
K2	172.81	178.09	-3.0	177.02	-2.4	174.19	-0.8	MultiPt	x	157.16	10.0
K1	23.69	22.77	4.0	23.68	0.0	23.92	-0.9	25.25	-6.2	21.55	9.9
QCSV1	3.88	4.15	-6.5	3.68	5.3	3.60	7.8	3.97	-2.3	4.73	-18.0
QCSV2	9.86	9.87	-0.1	9.59	2.8	9.60	2.7	8.72	13.1	10.17	-3.1
QCSV3	17.51	16.97	3.2	17.29	1.3	17.43	0.5	17.25	1.5	16.52	6.0
QCSV4	44.62	42.13	5.9	45.10	-1.1	45.41	-1.7	49.76	-10.3	37.91	17.7
QCSV5	65.71	62.43	5.3	67.07	-2.0	67.17	-2.2	70.58	-6.9	54.89	19.7
QCSV6	106.42	103.52	2.8	109.14	-2.5	108.32	-1.8	MultiPt	x	89.76	18.6
QCSV7	216.41	232.95	-7.1	220.81	-2.0	216.72	-0.1	MultiPt	x	211.53	2.3
QCSV8	199.27	210.81	-5.5	203.70	-2.2	200.08	-0.4	MultiPt	x	189.02	5.4
QCSV9	374.28	486.45	-23.1	375.63	-0.4	369.52	1.3	744.03	-49.7	547.23	-31.6
QCSV10	420.85	580.72	-27.5	419.27	0.4	413.64	1.7	747.79	-43.7	727.08	-42.1
QCMS1	13.49	13.29	1.5	13.26	1.7	13.34	1.1	12.26	10.0	13.26	1.7
QCMS2	54.69	51.96	5.3	55.82	-2.0	56.06	-2.4	60.33	-9.3	46.14	18.5
QCMS3	120.17	118.03	1.8	123.18	-2.4	121.98	-1.5	MultiPt	x	102.39	17.4
11	36.75	34.83	5.5	37.05	-0.8	37.37	-1.6	41.11	-10.6	31.79	15.6
12	146.30	146.92	-0.4	149.90	-2.4	147.90	-1.1	MultiPt	x	128.18	14.1
13	227.69	248.26	-8.3	232.22	-2.0	227.83	-0.1	MultiPt	x	227.58	0.0

Estradiol Konzentration, pg mL⁻¹:

Probenbezeichnung	Referenzalgorithmus	4 Parameter Methode	Abweichung zur Referenzmethode, %	4 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	5 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	Cubic Spline	Abweichung zur Referenzmethode, %	LogitLog	Abweichung zur Referenzmethode, %
K2	13.09	13.75	-4.8	13.59	-3.7	13.45	-2.7	keine Auswertung möglich	x	13.64	-4.1
K1	2.19	2.07	5.8	2.11	4.0	2.11	3.6		x	1.91	14.6
QCSV1	0.72	0.72	0.1	0.70	2.1	0.69	3.8		x	0.71	1.8
QCSV2	0.99	0.92	7.1	0.92	7.9	0.91	9.1		x	0.89	11.3
QCSV3	3.23	3.09	4.5	3.16	2.1	3.18	1.5		x	2.83	14.0
QCSV4	2.10	1.97	6.6	2.00	4.9	2.01	4.6		x	1.82	15.3
QCSV5	5.41	5.31	1.9	5.44	-0.5	5.46	-1.0		x	4.89	10.6
QCSV6	8.26	8.28	-0.3	8.40	-1.7	8.40	-1.6		x	7.79	6.0
QCSV7	20.23	22.28	-9.2	21.01	-3.7	20.61	-1.9		x	24.55	-17.6
QCSV8	17.58	19.05	-7.7	18.30	-3.9	17.99	-2.3		x	20.12	-12.6
QCSV9	36.54	44.42	-17.7	36.93	-1.0	36.22	0.9		x	> Max	x
QCSV10	55.03	> Max	x	52.97	3.9	52.93	4.0		x	> Max	x
QCSV11	0.47	0.47	0.7	0.44	5.7	0.43	8.5		x	0.48	-2.9
QCNSV1	1.22	1.14	7.0	1.14	7.0	1.13	7.7		x	1.08	12.9
QCNSV2	0.97	0.92	4.9	0.92	5.7	0.91	6.9		x	0.89	9.0
QCNSV3	1.66	1.57	5.8	1.59	4.6	1.59	4.7		x	1.46	13.5
QCNSV4	1.32	1.24	6.9	1.24	6.5	1.23	7.0		x	1.17	13.3
QCNSV5	1.18	1.14	3.5	1.14	3.5	1.13	4.1	x	1.08	9.2	

DHEA Konzentration, pg mL⁻¹:

Probenbezeichnung	Referenzalgorithmus	4 Parameter Methode	Abweichung zur Referenzmethode, %	4 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	5 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	Cubic Spline	Abweichung zur Referenzmethode, %	LogitLog	Abweichung zur Referenzmethode, %
K2	407.48	342.31	19.0	405.05	0.6	405.04	0.6	594.75	-31.5	335.59	21.4
K1	72.97	66.29	10.1	72.71	0.4	72.72	0.4	82.08	-11.1	62.61	16.5
QCSV1	3.82	5.63	-32.2	3.88	-1.6	3.88	-1.5	6.84	-44.2	6.25	-38.9
QCSV2	33.53	33.75	-0.7	33.45	0.2	33.45	0.2	27.13	23.6	32.87	2.0
QCSV3	63.69	58.92	8.1	63.63	0.1	63.64	0.1	73.60	-13.5	55.88	14.0
QCSV4	116.82	101.57	15.0	116.76	0.1	116.77	0.0	113.78	2.7	95.03	22.9
QCSV5	117.73	101.57	15.9	116.76	0.8	116.77	0.8	113.78	3.5	95.03	23.9
QCSV6	364.48	303.58	20.1	361.20	0.9	361.19	0.9	515.64	-29.3	294.16	23.9
QCSV7	474.14	403.94	17.4	472.71	0.3	472.69	0.3	680.69	-30.3	403.90	17.4
QCSV8	816.38	756.42	7.9	815.87	0.1	815.77	0.1	908.34	-10.1	857.77	-4.8
QCSV9	779.52	712.00	9.5	776.26	0.4	776.17	0.4	890.42	-12.5	794.11	-1.8
QCSV10	1381.17	1510.30	-8.5	1374.40	0.5	1374.20	0.5	1076.30	28.3	2314.40	-40.3
QCSV11	15.04	17.26	-12.8	15.09	-0.3	15.09	-0.3	14.18	6.1	17.54	-14.3
QCSV12	80.66	72.51	11.2	80.42	0.3	80.43	0.3	88.49	-8.8	68.30	18.1
QCSV13	272.35	226.80	20.1	271.20	0.4	271.20	0.4	223.59	21.8	215.30	26.5

IRT Konzentration, ng mL⁻¹:

Probenbezeichnung	Referenzalgorithmus 1)	4 Parameter Methode	Abweichung zur Referenzmethode, %	4 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	5 Parameter Methode (Marquardt)	Abweichung zur Referenzmethode, %	Cubic Spline	Abweichung zur Referenzmethode, %	Referenzalgorithmus 2)	Regression	Abweichung zur Referenzmethode, %
K2	237.35	222.37	6.7	238.19	-0.4	238.13	-0.3	257.26	-7.7	240.29	239.63	0.3
K1	97.83	110.62	-11.6	96.732	1.1	96.736	1.1	84.04	16.4	97.43	97.43	0.0
QCVB1	26.78	45.62	-41.3	25.902	3.4	25.901	3.4	30.62	-12.5	25.30	25.36	-0.2
QCVB2	34.71	53.78	-35.5	33.511	3.6	33.515	3.6	36.09	-3.8	33.22	33.16	0.2
QCVB4	55.17	73.53	-25.0	53.787	2.6	53.796	2.6	49.71	11.0	53.88	53.86	0.0
QCVB5	78.91	94.59	-16.6	77.574	1.7	77.582	1.7	66.24	19.1	78.06	78.03	0.0
QCVB6	103.69	115.45	-10.2	102.63	1.0	102.63	1.0	92.22	12.4	103.43	103.39	0.0
QCVB7	120.97	129.54	-6.6	120.13	0.7	120.12	0.7	131.93	-8.3	121.16	121.06	0.1
QCVB8	157.21	158.64	-0.9	157.04	0.1	157.02	0.1	185.41	-15.2	158.34	158.23	0.1
QCVB9	178.68	175.73	1.7	178.93	-0.1	178.9	-0.1	207.70	-14.0	180.35	180.23	0.1
QCVB10	208.26	199.24	4.5	208.97	-0.3	208.92	-0.3	234.15	-11.1	210.62	210.37	0.1
QCVB11	205.20	196.69	4.3	205.73	-0.3	205.68	-0.2	231.45	-11.3	207.49	207.11	0.2
QCVB12	253.21	235.42	7.6	254.44	-0.5	254.38	-0.5	269.38	-6.0	256.13	255.89	0.1
291	28.80	47.71	-39.6	27.802	3.6	27.803	3.6	32.02	-10.1	27.31	27.31	0.0
292	57.12	75.30	-24.1	55.703	2.5	55.712	2.5	50.98	12.0	55.87	55.81	0.1
293	115.58	125.16	-7.7	114.65	0.8	114.64	0.8	118.39	-2.4	115.62	115.53	0.1
294	152.44	154.84	-1.5	152.19	0.2	152.17	0.2	179.94	-15.3	153.45	153.36	0.1

Tabelle 6: Zusammenfassung der Abweichungen der Standardkurvenanalysen zur Referenzmethode in %.

Die Tabelle fasst die ermittelten Abweichungen für die einzelnen Tests und Algorithmen summarisch zusammen.

	<i>4 Parameter Methode</i>	<i>4 Parameter Methode (Marquardt)</i>	<i>5 Parameter Methode (Marquardt)</i>	<i>Cubic Spline</i>	<i>Logit Log</i>	<i>Regression</i>
<i>Cortisol</i>	-22 bis 5	-3 bis 2	-2 bis 3	-41 bis 7	-3 bis 14	-
<i>Progesteron</i>	-5 bis 2	-1 bis 1	-1 bis 2	-64 bis 7	-39 bis 9	-
<i>Testosteron</i>	-28 bis 6	-2 bis 5	-2 bis 8	-50 bis 13	-42 bis 20	-
<i>Estradiol</i>	-18 bis 7	-4 bis 8	-3 bis 9	-	-18 bis 15	-
<i>DHEA</i>	-32 bis 20	-2 bis 1	-2 bis 1	-44 bis 28	-40 bis 24	-
<i>IRT</i>	-41 bis 8	-1 bis 5	-1 bis 4	-15 bis 19	-	-0.2 bis 0.3

Dabei zeigt sich, dass die geringsten Abweichungen für die Steroidhormonassays zur Referenzmethodik MikroWin mit den Algorithmen Varianten Vier-Parameter-Marquardt und Fünf-Parameter-Marquardt der Magellan Software erhalten werden. Für IRT wird zusätzlich mit der Regression die beste Übereinstimmung erzielt.

Bei den Varianten Vier-Parameter-Marquardt, Fünf-Parameter-Marquardt sowie zusätzlich Regression bei IRT liegen die Differenzen der Konzentrationsermittlungen im Durchschnitt unter den geforderten 5% und die kritischen Kurvenabschnitte der Standardkurven weisen keine besonderen Auffälligkeiten auf.

5.3.3. Messung der Lumineszenz: Cross-talk Testung

Die gemessenen RLUs sowie die anhand der am Plattenanfang in Vierfachbestimmung mitgeführten Standardkurve ausgewerteten Konzentrationen werden im Anhang aufgeführt. In den nachfolgenden Tabellen 7-12 werden die Ergebnisse der Cross-talk Testung gezeigt.

Angegeben werden die Mittelwerte der RLU (MV RLU) und Konzentrationen in pg/mL (MV pg/mL) sowie der RLU Variationskoeffizient (RLU CV) in Prozent und die Differenzierung ($B/B_0, \%$), in Bezug auf Standard A_1 in Prozent angegeben. Für alle Messungen mit dem Infinite wird eine Abweichung der RLU (RLU dev., %) und Konzentration (conc. dev., %) zu dem CentrolIA in Prozent angegeben.

Tabelle 7: CentrolIA Messung, 200ms.

	MV RLU	MV pg/mL	RLU CV, %	B/B₀, %
Standard A_1	908266	0.01	3	100
Standard B_1	748815	1.22	2	82
Standard C_1	660435	2.12	1	73
Standard D_1	562912	3.36	3	62
Standard E_1	346269	8.20	3	38
Standard F_1	193278	17.40	1	21
Standard G_1	65049	57.80	2	7
Kitkontrolle2_1	246480	12.97	1	27
Kitkontrolle1_1	610409	2.72	0	67
Kitkontrolle1_2	660308	2.12	1	73
Kitkontrolle2_2	271282	11.53	10	30
Standard A_2	876757	0.18	5	97
Kitkontrolle1_3	635631	2.41	0	70
Kitkontrolle2_3	247752	12.88	1	27
Standard A_3	907168	0.22	1	100
Standard A_4	863982	0.22	4	95
Standard G_2	64315	58.84	7	7
Kitkontrolle1_4	640800	2.35	0	71
Kitkontrolle2_4	240292	13.38	1	26
Standard D_2	539302	3.72	5	59
Standard E_2	336192	8.55	3	37
Standard F_2	179449	18.97	2	20
Kitkontrolle2_5	243563	13.16	1	27

Tabelle 8: Infinite Messung, 200ms, keine Filterabschwächung.

	MV RLU	MV pg/mL	RLU CV, %	B/B ₀ , %	RLU dev., %	conc. dev., %
Standard A_1	329410	0.06	2	100	-64	>
Standard B_1	295243	1.13	1	90	-61	-7
Standard C_1	263955	2.17	1	80	-60	3
Standard D_1	225928	3.56	2	69	-60	6
Standard E_1	142733	8.21	3	43	-59	0
Standard F_1	79350	16.97	1	24	-59	-2
Standard G_1	28490	56.52	4	9	-56	-2
Kitkontrolle2_1	98779	13.17	0	30	-60	2
Kitkontrolle1_1	241330	2.97	0	73	-60	9
Kitkontrolle1_2	249605	2.67	0	76	-62	26
Kitkontrolle2_2	113650	11.17	10	35	-58	-3
Standard A_2	353968	0.01	4	107	-60	>
Kitkontrolle1_3	258815	2.34	0	79	-59	-3
Kitkontrolle2_3	102660	12.58	2	31	-59	-2
Standard A_3	352375	0.00	3	107	-61	>
Standard A_4	347623	0.00	3	106	-60	>
Standard G_2	32524	47.44	12	10	-49	-19
Kitkontrolle1_4	253175	2.54	2	77	-60	8
Kitkontrolle2_4	102915	12.54	0	31	-57	-6
Standard D_2	222790	3.69	4	68	-59	-1
Standard E_2	137923	8.62	3	42	-59	1
Standard F_2	75064	18.07	1	23	-58	-5
Kitkontrolle2_5	100441	12.92	3	30	-59	-2
				Σ	-59	0

Tabelle 9: Infinite Messung, 200ms, automatische Filterabschwächung.

	MV RLU	MV pg/mL	RLU CV, %	B/B ₀ , %	RLU dev., %	conc. dev., %
Standard A_1	326418	0.02	2	100	-64	>
Standard B_1	267355	1.14	1	82	-64	-7
Standard C_1	234063	2.06	2	72	-65	-3
Standard D_1	200285	3.29	3	61	-64	-2
Standard E_1	122238	8.50	3	37	-65	4
Standard F_1	68810	18.16	2	21	-64	4
Standard G_1	22928	54.28	2	7	-65	-6
Kitkontrolle2_1	86775	13.68	0	27	-65	6
Kitkontrolle1_1	219715	2.54	2	67	-64	-7
Kitkontrolle1_2	239265	1.90	0	73	-64	-10
Kitkontrolle2_2	96989	11.90	10	30	-64	3
Standard A_2	319639	0.12	4	98	-64	-37
Kitkontrolle1_3	230920	2.16	1	71	-64	-10
Kitkontrolle2_3	89291	13.19	1	27	-64	2
Standard A_3	330583	0.14	1	101	-64	-39
Standard A_4	316508	0.14	3	97	-63	-39
Standard G_2	24911	50.93	11	8	-61	-13
Kitkontrolle1_4	237015	1.97	0	73	-63	-16
Kitkontrolle2_4	87641	13.51	1	27	-64	1
Standard D_2	198570	3.36	4	61	-63	-10
Standard E_2	123647	8.35	3	38	-63	-2
Standard F_2	64607	19.53	1	20	-64	3
Kitkontrolle2_5	87489	13.54	2	27	-64	3
				Σ	-64	-8

Tabelle 10: Infinite Messung, 100ms, automatische Filterabschwächung.

	MV RLU	MV pg/mL	RLU CV, %	B/B ₀ , %	RLU dev., %	conc. dev., %
Standard A_1	283005	0.04	3	100	-69	>
Standard B_1	249648	1.13	1	88	-67	-7
Standard C_1	219605	2.25	2	78	-67	6
Standard D_1	193518	3.36	3	68	-66	0
Standard E_1	118830	8.37	2	42	-66	2
Standard F_1	66700	17.21	1	24	-65	-1
Standard G_1	22618	55.66	2	8	-65	-4
Kitkontrolle2_1	85635	12.86	1	30	-65	-1
Kitkontrolle1_1	212605	2.53	0	75	-65	-7
Kitkontrolle1_2	206995	2.76	0	73	-69	30
Kitkontrolle2_2	89083	12.32	9	31	-67	7
Standard A_2	312022	0.00	4	110	-64	>
Kitkontrolle1_3	223565	2.09	1	79	-65	-13
Kitkontrolle2_3	87890	12.47	3	31	-65	-3
Standard A_3	302238	0.00	3	107	-67	>
Standard A_4	311003	0.00	4	110	-64	>
Standard G_2	22301	56.17	4	8	-65	-5
Kitkontrolle1_4	219275	2.26	1	77	-66	-4
Kitkontrolle2_4	84698	13.04	3	30	-65	-3
Standard D_2	196270	3.24	4	69	-64	-13
Standard E_2	123350	7.93	4	44	-63	-7
Standard F_2	64760	17.79	1	23	-64	-6
Kitkontrolle2_5	87737	12.49	2	31	-64	-5
				Σ	-65	-2

Tabelle 11: Infinite Messung, 400ms, automatische Filterabschwächung.

	MV RLU	MV pg/mL	RLU CV, %	B/B ₀ , %	RLU dev., %	conc. dev., %
Standard A_1	271223	0.02	2	100	-70	>
Standard B_1	233170	1.15	1	86	-69	-6
Standard C_1	205108	2.19	3	76	-69	3
Standard D_1	179798	3.30	3	66	-68	-2
Standard E_1	110295	8.42	2	41	-68	3
Standard F_1	62316	17.60	1	23	-68	1
Standard G_1	21497	54.92	1	8	-67	-5
Kitkontrolle2_1	80165	12.99	0	30	-67	0
Kitkontrolle1_1	200550	2.37	2	74	-67	-13
Kitkontrolle1_2	199920	2.39	0	74	-70	13
Kitkontrolle2_2	82425	12.62	10	30	-70	9
Standard A_2	290571	0.02	4	107	-67	-91
Kitkontrolle1_3	207070	2.10	1	76	-67	-12
Kitkontrolle2_3	82139	12.60	1	30	-67	-2
Standard A_3	287528	0.00	2	106	-68	>
Standard A_4	292695	0.00	3	108	-66	>
Standard G_2	20479	57.85	4	8	-68	-2
Kitkontrolle1_4	204250	2.22	0	75	-68	-5
Kitkontrolle2_4	77560	13.54	0	29	-68	1
Standard D_2	181433	3.23	4	67	-66	-13
Standard E_2	113923	8.03	4	42	-66	-6
Standard F_2	60483	18.22	2	22	-66	-4
Kitkontrolle2_5	81041	12.82	1	30	-67	-3
				Σ	-68	-7

Tabelle 12: Zusammenstellung der RLUs und Differenzierungen der Standardkurven der verschiedenen Messungen.

Hier sind die RLU Mittelwerte für die Standardreihe (RLU) sowie die Differenzierung (B/B₀,%) vergleichend für die verschiedenen Messungen aufgezeigt.

	Centro LIA (Referenz)		Infinite (Testgerät)							
	200ms, auto		100 ms, auto		200ms, auto		200ms, none		400ms, auto	
	RLU	B/B ₀ , %	RLU	B/B ₀ , %	RLU	B/B ₀ , %	RLU	B/B ₀ , %	RLU	B/B ₀ , %
Std A	908266	100	283005	100	326418	100	329410	100	271223	100
Std B	748815	82	249648	88	267355	82	295243	90	233170	86
Std C	660435	73	219605	78	234063	72	263955	80	205108	76
Std D	562912	62	193518	68	200285	61	225928	69	179798	66
Std E	346269	38	118830	42	122238	37	142733	43	110295	41
Std F	193278	21	66700	24	68810	21	79350	24	62316	23
Std G	65049	7	22618	8	22928	7	28490	9	21497	8

Für jede Messung wurde die Abweichung der gemessenen RLUs mit dem Infinite im Vergleich zum CentroLIA angegeben. Für einzelne Werte, bei denen die Konzentration im Bereich von 0.00 bis 0.06 pg/mL liegt, wird die Abweichung nicht berücksichtigt, da diese mathematisch bedingt für den kleinen Konzentrationsbereich sehr hohe Abweichungswerte ergibt.

Es zeigt sich, dass bei den Varianten automatische Filterabschwächung: 100ms sowie keine automatische Abschwächung: 200ms teilweise Konzentrationswerte nicht berechnet werden können (sie müssten extrapoliert werden) und mit > gekennzeichnet werden.

Bei der Variante 200ms, keine automatische Abschwächung, ist einmal Kitkontrolle 2 außerhalb des Zielbereiches.

Bei der Variante 200ms, automatische Filterabschwächung, gibt es keine Auffälligkeiten.

Bei der Betrachtung der Differenzierung zeigt sich, dass alle Varianten außer 200ms, automatische Filterabschwächung, keine gute Übereinstimmung zu den CentroLIA Werten zeigen. Es sind bei allen Varianten keine signifikanten Effekte an Überstrahlung oder Drifteffekten zu bemerken.

5.3.4. Plattenpräzisionen

Die Auswertung der Intra-Platten Präzisionstestungen erfolgte anhand des Qualitätskontroll-Formblattes für Platten-Variationskoeffizient Testung. Beispielhaft ist in Abbildung 8 die Auswertung von einer durchgeführten Messung gezeigt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	\bar{RLU}	CV%
A	331620	321590	333170	332970	324640	334270	335660	339860	340250	344810	343700	356920	336622	2.8%
B	348090	355890	342250	345210	344210	343070	343380	336070	348240	338690	346890	353870	345488	1.6%
C	344430	339660	328770	340390	345960	333580	339270	349220	344700	349890	356780	343920	343048	2.2%
D	331310	324690	328480	332350	329920	332750	330430	329490	337230	327680	338890	335220	331537	1.2%
E	335290	329880	330240	334770	337390	333030	320980	312450	326150	316760	345160	336400	329875	2.8%
F	327840	325930	333310	318780	327070	327400	324980	337410	324800	314640	338110	328100	327364	2.1%
G	319750	323970	326170	318070	319890	322870	302940	302100	317990	338480	336910	330030	321598	3.5%
H	316050	318410	312870	310400	325230	325420	314150	321980	321220	317680	317000	333610	319502	2.0%
\bar{MV}	331798	330003	329408	329118	331789	331549	326474	328573	332573	331079	340430	339759	331879	3.5%
CV%	3.3%	3.7%	2.5%	3.7%	2.9%	1.9%	4.2%	4.7%	3.4%	4.1%	3.4%	3.2%		

RLU - Variation							
\bar{RLU}_{total}	CV_{total}	RLU_{min}	RLU_{max}	Δ	\bar{RLU}_{out}	\bar{RLU}_{in}	Δ
331879	3.5%	302100	356920	15.4%	330770	331258	0.1%

RLU MV strip 1	RLU MV strip 2-12	Dev. %
331798	331886	0.0

	Min / Max
	> mean
	< mean

Abbildung 8: Auswertung des Platten-CVs am Beispiel von Estradiol, Std. A, gemessen mit dem Infinite Luminometer, 200ms Integrationszeit und automatischer Filterabschwächung.

Die Abbildung zeigt die erhaltenen Messwerte (RLU) im Mikrotiterplattenformat. Durch Farbmarkierungen werden der niedrigste und höchste Messwert rot hinterlegt gekennzeichnet. Der entsprechende Messwert wird im Kasten mit der Bezeichnung RLU-Variation angegeben. Messwerte, welche sich oberhalb des Mittelwertes befinden, werden blau markiert und Messwerte, die unterhalb des Mittelwertes liegen, werden gelb markiert. Jeweils pro Spalte und pro Zeile wird der Mittelwert (\bar{RLU}) sowie der Variationskoeffizient in Prozent (CV%) angegeben. Der Gesamtvariationskoeffizient sowie der Gesamtmittelwert der gemessenen RLU werden angegeben. \bar{RLU}_{out} bezeichnet den sich aus den Werten des äußeren Rahmens (Zeile A und H sowie Spalte 1 und 12) ergebenden Mittelwert, der analoge Wert für den inneren Bereich wird mit \bar{RLU}_{in} bezeichnet. Die Abweichung zwischen \bar{RLU}_{out} und \bar{RLU}_{in} wird unter Δ angegeben. Von dem Mittelwert der ersten Spalte und dem Mittelwert von Spalte 2 bis 12 wird eine Abweichung berechnet.

In Tabelle 13 sind die erhaltenen Ergebnisse für alle durchgeführten Messungen vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 13: Zusammenstellung der Ergebnisse der Intra-Plattenpräzision

Beispielhaft wurden für die Plattenpräzisionstestung die Teste Estradiol und Cortisol betrachtet. Für den Parameter Estradiol wurde jeweils eine ganze Mikrotiterplatte mit Standard A und Standard G als Probe befüllt. Für den Parameter Cortisol wurde jeweils für die 20 und 50µL Testvariante Standard A und Standard G als Probe pipettiert. Von den erhaltenen Messdaten werden nachfolgend aufgelistete Werte berechnet.

RLU CV, %: Gesamtvariationskoeffizient der RLU

MW RLU: Gesamtmittelwert der RLU

RLU_{min} und RLU_{max}: niedrigster und höchster RLU Messwert

delta RLU min-max, %: prozentuale Abweichung zwischen niedrigstem und höchstem RLU Messwert

delta RLU in-out, %: prozentuale Abweichung zwischen dem RLU Mittelwert des äußeren Bereichs der Mikrotiterplatte (Zeile A und H, Spalte 1 und 12) sowie dem Mittelwert der RLU im inneren Bereich (Rest) der Mikrotiterplatte

	Referenz- gerät	Infinite 200ms, auto	Abweichung zum Referenz- gerät	Infinite 200ms, none	Abweichung zum Referenz- gerät
Estradiol, Standard A					
RLU CV, %	3.3	3.5	6	3.0	-9
MW RLU	876593	331879	-62	313539	-64
RLU _{min}	794393	302100	-62	287350	-64
RLU _{max}	948251	356920	-62	333550	-65
delta RLU min-max, %	16.2	15.4	-5	13.9	-14
delta RLU in-out, %	-0.5	0.1	-120	1.2	-340
Estradiol, Standard G					
RLU CV, %	8.3	6.3	-24	8.8	6
MW RLU	57253	21449	-63	21359	-63
RLU _{min}	45543	18357	-60	17621	-61
RLU _{max}	71099	27127	-62	25914	-64
delta RLU min-max, %	35.9	32.3	-10	32.0	-11
delta RLU in-out, %	-1.6	-1.3	-19	-3.8	138
Cortisol, Standard A, 20µL					
RLU CV, %	2.3	2.5	9	2.7	17
MW RLU	19016474	7522405	-60	7993211	-58
RLU _{min}	17863296	7130800	-60	7497200	-58
RLU _{max}	19919047	7929200	-60	8450700	-58
delta RLU min-max, %	10.3	10.1	-2	11.3	10
delta RLU in-out, %	2.1	1.2	-43	0.7	-67
Cortisol, Standard A, 50µL					
RLU CV, %	2.5	2.7	8	3.0	20
MW RLU	18974856	7443041	-61	7942561	-58
RLU _{min}	17660744	6909100	-61	7253300	-59
RLU _{max}	19967285	7912800	-60	8448600	-58
delta RLU min-max, %	11.6	12.7	9	14.1	22
delta RLU in-out, %	2.7	1.6	-41	1.3	-52
Cortisol, Standard G, 20µL					
RLU CV, %	4.6	4.8	4	4.9	7
MW RLU	928538	336405	-64	339132	-63
RLU _{min}	792814	276240	-65	279090	-65
RLU _{max}	982022	373600	-62	375630	-62
delta RLU min-max, %	19.3	26.1	35	25.7	33
delta RLU in-out, %	4.4	1	-77	2.8	-36
Cortisol, Standard G, 50µL					
RLU CV, %	5.2	5.8	12	5.5	6
MW RLU	401637	151928	-62	148896	-63
RLU _{min}	344603	126050	-63	124460	-64
RLU _{max}	473713	184910	-61	178920	-62
delta RLU min-max, %	27.3	31.8	16	30.4	11
delta RLU in-out, %	-0.8	-4.5	463	-3.4	325

Die erhaltenen RLU-Messsignale verhalten sich wie in den bisherigen Messungen (Crosstalk), das Infinite Messgerät liefert RLU-Messwerte, die im Bereich von 60–65% tiefer als beim Referenzgerät liegen, der Faktor zwischen den RLU-Signalen Infinite und CentroLIA liegt im Bereich von 2.5–2.7.

Anhand der Ergebnisse aus Cross-talk Testung und Plattenpräzisionstestung wird festgelegt, die Version mit einer Integrationszeit von 200ms sowie Wahl der automatischen Filterabschwächung als Standardeinstellung für Lumineszenz-Messungen mit dem Infinite zu setzen.

5.3.5. Differenzierung und Konzentrationsermittlungen

Im Folgenden werden in Tabelle 15 bis 19 die Ergebnisse für die einzelnen Assays und Messgeräte zusammengefasst.

Tabelle 14: Vergleich der RLU-Abweichungen zwischen den Standardkurven am Anfang und am Ende der MTP für Referenz- und Testgerät.

Die Differenzen der prozentualen Abweichungen der Standards je nach Position (Anfang vs. Ende der Platte) und zwischen den Geräten werden für die durchgeführten Assays aufgeführt.

Assay	CentroLIA	Infinite	Differenzen zwischen Geräten, %
	Abw. 1 vs. 2, %	Abw. 1 vs. 2, %	
Cortisol (LCO, 50µL)	-0.5	-3.9	3.4
Cortisol (LCL)	7.3	1.9	5.4
DHEA (LDH)	0.7	1.9	1.2
Estradiol (LES)	-1.9	0.6	2.5
Testosteron (LTE)	8.8	9.9	1.1
Progesteron (LPR)	1.2	2.3	1.1
IRT (LIT)	8.6	4.6	4.0
Gesamtmittelwert	3.5	2.5	2.7

Tabelle 15: Mittelwerte der Abweichungen zum Zielwert der gemessenen Konzentrationswerte für Kitkontrollen und QC-Proben, Standardkurve am Anfang.

Von den jeweils erhaltenen Konzentrationswerten für Kitkontrollen und QC-Proben (ermittelt über die erste Standardreihe auf der Platte) wird eine Abweichung zum Zielwert bestimmt. Je Testansatz wird aus diesen Abweichungen ein Mittelwert gebildet, welcher unter den beiden Luminometern verglichen wird.

Assay	CentroLIA	Infinite	Differenzen zwischen Geräten, %
	Abw., %	Abw., %	
Cortisol (LCO, 50µL)	-9.1	-6.0	3.1
Cortisol (LCL)	-9.1	-10.3	1.2
DHEA (LDH)	2.6	7.1	4.5
Estradiol (LES)	-22.0	-24.3	2.3
Testosteron (LTE)	-12.3	-11.5	0.8
Progesteron (LPR)	3.5	-3.1	6.6
IRT (LIT)	8.5	5.2	3.3
Gesamtmittelwert	-5.4	-6.1	3.1

Tabelle 16: Mittelwerte der Abweichungen zum Zielwert der gemessenen Konzentrationswerte für Kitkontrollen und QC-Proben, Standardkurve am Ende.

Von den jeweils erhaltenen Konzentrationswerten für Kitkontrollen und QC-Proben (ermittelt über die zweite Standardreihe auf der Platte) wird eine Abweichung zum Zielwert bestimmt. Je Testansatz wird aus diesen Abweichungen ein Mittelwert gebildet, welcher unter den beiden Luminometern verglichen wird.

Assay	CentroLIA	Infinite	Differenzen zwischen Geräten, %
	Abw., %	Abw., %	
Cortisol (LCO, 50µL)	-10.1	-10.4	0.3
Cortisol (LCL)	-7.1	-5.5	1.6
DHEA (LDH)	-1.2	5.2	6.4
Estradiol (LES)	-25.5	-24	1.5
Testosteron (LTE)	2.5	5.3	2.8
Progesteron (LPR)	6.3	1.7	4.6
IRT (LIT)	1.8	3.2	1.4
Gesamtmittelwert	-4.8	-3.5	2.7

Tabelle 17: Korrelationsergebnisse für beide Geräte.

Die mit den Messgeräten CentroLIA sowie Infinite ermittelten Konzentrationen für Kitkontrollen und QC-Proben wurden anhand einer linearen Regression mit Excel analysiert. Hierzu wurden die Daten in einem Punktdiagramm aufgetragen (x-Achse: mit CentroLIA ermittelte Konzentration, y-Achse: mit Infinite ermittelte Konzentration). Mittels Trendlinienoptionen (linear) werden die nachfolgend gezeigten Korrelationsdaten $mx+b$ sowie R^2 und R bestimmt.

Assay	1. Standardkurve			2. Standardkurve		
	$mx+b$	R	R^2	$mx+b$	R	R^2
Cortisol (LCO, 50 μ L)	1.017x+0.005	0.999	0.999	0.9669x+0.0046	0.999	0.999
Cortisol (LCL)	-	-	-	1.0388x-0.0041	0.996	0.992
DHEA (LDH)	0.9387x+18.349	0.316	0.100	1.0076x+13.088	0.999	0.997
Estradiol (LES)	0.9621x-0.0312	1.000	0.999	0.9974x+0.1346	1.000	0.999
Testosteron (LTE)	0.948x+2.4722	0.999	0.999	0.9923x+2.0691	1.000	0.999
Progesteron (LPR)	0.8368x+7.1053	0.996	0.992	0.8794x+6.0246	0.996	0.992
IRT (LIT)	.9733x-0.0811	0.999	0.998	1.0113x+0.3695	0.999	0.998
Gesamtmittelwert	-	0.921	0.848	-	0.998	0.997

Hinweis zur Messung des Cortisol (LCL): Zum Zeitpunkt der Messung wurde ein Defekt beim Referenzmessgerät CentroLIA festgestellt. Dieser Fehler führte zu falschen Messsignalen in den Wells A1-4 und B1-4, was sich in fehlerhaften Ergebnissen für die Standardkurve am Anfang auswirkt. Das Referenzgerät wurde daraufhin zur Wartung an den Hersteller übergeben, eine vergleichende Auswertung erfolgt somit für den LCL nur anhand der Standardkurve am Ende der Mikrotiterplatte.

Tabelle 18: Abweichungen von RLU/RLU_{max} in Prozent zwischen den beiden Geräten.

Für die Standardreihen am Anfang und Ende der Mikrotiterplatte wird die Differenzierung (RLU/RLU_{max}) in Prozent berechnet und die Abweichung zwischen den beiden Geräten verglichen.

Assay	erste Standardkurve	zweite Standardkurve	Mittelwert, %
	Abw., %	Abw., %	
Cortisol (LCO, 50 μ L)	-4.1	-2.5	-3.3
Cortisol (LCL)	x	-3.6	-3.6
DHEA (LDH)	10.3	3.9	7.1
Estradiol (LES)	7.2	3.9	5.6
Testosteron (LTE)	5.0	2.4	3.7
Progesteron (LPR)	-1.0	0.4	-0.3
IRT (LIT)	-0.7	-0.8	-0.8
Gesamtmittelwert	2.8	0.5	1.2

5.4. Leistungs(Performance)-Qualifizierung (PQ)

Während der Leistungs-Qualifizierungs Phase wurden je Parameter, in Abhängigkeit vom Routineaufkommen der Chargenherstellungen, ein bis drei Lumineszenzassays vermessen und ausgewertet. Die Assays wurden auf dem Referenzgerät (CentroLIA) sowie auf dem Infinite Gerät gemessen. Für jede Testung wurden eine Standardreihe, Kitkontrollen sowie die jeweils testspezifischen Qualitäts-kontrollproben mitgeführt. Die erhaltene Messergebnisse (RLUs), die anhand der Standardkurve berechneten Konzentrationen sowie das jeweilige Differenzierungsverhalten der Standards wurden zwischen beiden Messgeräten vergleichend analysiert. Hierbei wurden besonders die jeweiligen Abweichungen der gemessenen RLUs der Standards und ihr Differenzierungsverhalten (RLU/RLU_{max}) untersucht sowie auch der Zusammenhang der jeweilig ermittelten Konzentrationswerte der Proben mittels linearer Regression. Die Läufe der PQ-Testungen wurden analog zu den OQ-Testungen ausgewertet, mit Ausnahme, dass nur eine Standardkurve mitgeführt wurde.

In den nachfolgenden Tabellen 20-22 werden die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst.

Tabelle 19: Mittelwerte der Gesamtabweichungen zum Mittelwert für die jeweiligen Bereiche der gemessenen Konzentrationswerte für Kitkontrollen und QC-Proben.

Die mit den Messgeräten CentrolIA sowie Infinite erhaltenen Konzentrationen für die QC-Proben und Kitkontrollen wurden in Bezug zu der jeweiligen Abweichung zum Bereichsmittelwert verglichen. Hieraus wurde je Test ein Gesamtmittelwert der Abweichungen zum Bereichsmittelwert bestimmt, der zwischen beiden Geräten verglichen wird. Die Tabelle fasst im Überblick die in der PQ-Phase ermittelten Abweichungen zum Mittelwert der jeweiligen Assays zusammen.

Assay	CentrolIA	Infinite	Differenzen zwischen Geräten, %
	Abw., %	Abw., %	
Cortisol (LCO, 20µL)	1.7	-1.5	3.2
Cortisol (LCL)	10.6	6.9	3.7
DHEA (LDH)_1	18.0	5.3	12.7
DHEA (LDH)_2	8.0	1.0	7.0
Estradiol (LES)_1	-17.1	-19.7	2.6
Estradiol (LES)_2	-5.9	-18.7	12.8
Estradiol (LEL)_1	-8.6	-16.2	7.6
Estradiol (LEL)_2	-8.8	-13.9	5.1
Testosteron (LTE)_1	-7.9	-5.9	2.0
Testosteron (LTE)_2	-9.5	-7.3	2.2
Testosteron (LTE)_3	-1.9	-4.2	2.3
Progesteron (LPR)_1	13.1	13.1	0.0
Progesteron (LPR)_2	11.4	5.1	6.3
IRT (LIT)_1	-1.2	-2.5	1.3
IRT (LIT)_2	6.9	6.5	0.4
Gesamtmittelwert	0.6	-3.5	4.6

Die Tabelle 20 gibt einen Überblick über die ermittelten Differenzen im Differenzierungsverhalten/Standardkurvenverlauf.

Tabelle 20: Abweichungen von RLU/RLUmax in Prozent zwischen den beiden Geräten.

Die mit den Messgeräten CentroLIA sowie Infinite gemessenen RLU und die daraus berechneten Differenzierungen für die Standards werden für beide Messgeräte verglichen. Es wird die Gesamtabweichung von RLU zu RLUmax in Prozent je Standardkurve und Assay angegeben.

Assay	Abw., %
Cortisol (LCO, 20µL)	6.7
Cortisol (LCL)	5.3
DHEA (LDH)_1	2.4
DHEA (LDH)_2	-3.6
Estradiol (LES)_1	-1.8
Estradiol (LES)_2	-1.9
Estradiol (LEL)_1	-8.0
Estradiol (LEL)_2	-4.8
Testosteron (LTE)_1	-4.2
Testosteron (LTE)_2	-7.5
Testosteron (LTE)_3	-6.3
Progesteron (LPR)_1	-2.4
Progesteron (LPR)_2	-7.1
IRT (LIT)_1	0.8
IRT (LIT)_2	0.3
Gesamtmittelwert	-2.1

Bei den Abweichungen der Differenzierungen der Standardkurve sind keine signifikanten oder systematischen Unterschiede erkennbar. Die Gesamtabweichung über alle Assays liegt hier unter 5%.

Die nachfolgende Tabelle 21 summiert die in der PQ-Phase ermittelten Korrelationen zwischen den Konzentrationswerten der Proben für beide Geräte.

Tabelle 21: Korrelationsergebnisse für beide Geräte

Die mit den Messgeräten CentroLIA sowie Infinite ermittelten Konzentrationen für Kitkontrollen und QC-Proben wurden anhand einer linearen Regression mit Excel analysiert. Hierzu wurden die Daten in einem Punktdiagramm aufgetragen (x-Achse: mit CentroLIA ermittelte Konzentration, y-Achse: mit Infinite ermittelte Konzentration). Mittels Trendlinienoptionen (linear) werden die nachfolgend gezeigten Korrelationsdaten $mx+b$ sowie R^2 und R bestimmt.

Assay	Korrelationsdaten		
	$mx+b$	R	R^2
Cortisol (LCO, 20μL)	1.021x-0.0087	0.999	0.998
Cortisol (LCL)	0.9199x+0.0213	0.998	0.997
DHEA (LDH)_1	0.7219x+34.344	0.988	0.976
DHEA (LDH)_2	0.7785x+27.298	0.992	0.984
Estradiol (LES)_1	0.9271x+0.0437	0.999	0.997
Estradiol (LES)_2	0.6811x+0.9859	0.982	0.964
Estradiol (LEL)_1	0.8501x+0.3328	0.998	0.996
Estradiol (LEL)_2	0.9571x-0.1258	0.996	0.993
Testosteron (LTE)_1	0.8863x+6.8454	0.998	0.996
Testosteron (LTE)_2	0.8719x+6.7449	0.998	0.996
Testosteron (LTE)_3	0.8708x+5.0089	0.998	0.996
Progesteron (LPR)_1	0.7618x+22.739	0.981	0.963
Progesteron (LPR)_2	0.7227x+22.079	0.973	0.948
IRT (LIT)_1	1.0006x-1.4034	0.999	0.999
IRT (LIT)_2	0.9913x+0.6036	1.000	0.999
Gesamtmittelwert	-	0.993	0.987

6. Diskussion

Die vorgesehenen Testungen für die Prozessvalidierung wurden erfolgreich durchgeführt und die vorgegebenen Kriterien erfüllt. Die Prozessvalidierung ist damit abgeschlossen und es sind keine weiteren Punkte mehr offen. Das Infinite Luminometer kann zur Messung der Lumineszenzteste bei IBL verwendet werden.

Während des Validierungszeitraumes durchlief sowohl das CentroLIA Referenzgerät als auch das Infinite-Luminometer erfolgreich alle Überprüfungszyklen mit den entsprechenden kalibrierten Testplatten. Die Funktionalität der beiden Geräte war über den gesamten Validierungszeitraum gewährleistet. Lediglich das CentroLIA befand sich kurzzeitig in Wartung.

Die optimale Filtereinstellung für das Infinite 200 wurde im Rahmen von Sensitivitätsanalysen (ATP-Sensitivitätstest) bei der Ermittlung der Sensitivität/ dem Detektionslimit untersucht. Unter Verwendung verschiedener Möglichkeiten der Filterwahl zeigte sich das beste Ergebnis für das Infinite Gerät bei Anwendung der automatischen Filterabschwächung.

Die Auswertungen mit dem CentroLIA Gerät wurden mit der MikroWin 2000 Software (Mikrotek) durchgeführt. Das Infinite Luminometer weist für diese Software keine Kompatibilität auf. Deshalb wurde für das Infinite die geräteeigene Magellan Software (Tecan) benutzt. Die Installation von Magellan wird als erfolgreich bewertet. Hinsichtlich der unterschiedlichen Software, MikroWin 2000 und Magellan, wurde eine retrospektive Auswertung bestehender Daten mit verschiedenen Algorithmen zur Kurvenberechnung für Magellan im Vergleich zur MikroWin Referenz Methode (4 Parameter Logistik) vorgenommen. Dabei zeigt sich, dass die geringsten Abweichungen zur Referenzmethodik mit den Algorithmen Varianten Vier-Parameter-Marquardt (für die Steroidassays Differenzbereich -4 bis +8%) und Fünf-Parameter-Marquardt (für die Steroidassays Differenzbereich -3 bis +9%) der Magellan Software erhalten werden. Für IRT wird zusätzlich mit der Regression die beste Übereinstimmung erzielt (Differenzbereich -0.2 bis 0.3%). Es wurde basierend auf den Daten entschieden, dass die Methode Vier-Parameter-Marquardt als Standardmethode für die Auswertung der verschiedenen Assays verwendet wird. Die anderen ausgetesteten Möglichkeiten der Standardkurvenanalyse werden aufgrund der schlechteren Übereinstimmung zur Referenzmethode nicht angewandt und müssen, sofern eine Anwendung doch erfolgen soll, individuell für jeden Parameter betrachtet

werden. Jedoch ist auch zu beachten, dass sich der Vergleich der Methoden in dieser Testung immer auf die aktuelle Referenzmethode bezieht. Zudem könnte ein Risiko dadurch bestehen, dass die QC-Probenbereiche und Kitkontrollbereiche, anhand derer die Testfreigaben geschehen, mit einer anderen Standardkurvenberechnungsmethode ermittelt wurde als ein Kunde sie nutzt, was eventuell zu Differenzen bei der Interpretation der vom Test ermittelten Konzentration führen könnte. Zum Ausschluss dieses Risikos sind bei entsprechendem Bedarf in den Arbeitsanweisungen der Assays die zu nutzenden Auswertungsalgorithmen zu definieren.

Die Lumineszenz-Messung mit Luminometern ist für die Durchführung und Auswertung von Lumineszenz-basierten Assays von entscheidender Bedeutung. Das zu bewertende Risiko besteht in der bauartbedingten unterschiedlichen Messung von Lumineszenzwerten (relativen light units = RLU), die zu verschiedenen Auswertungsergebnissen von Lumineszenz-Assays führen können. Die gemessenen RLU's müssen nicht zwangsläufig in ihren Absolutwerten übereinstimmen, sollten jedoch die gleiche Differenzierung von Analyten gewährleisten sowie zu einer vergleichbaren Sensitivität der Messparameter und Präzision in der Probenmessung durch das Infinite Gerät im Vergleich zum CentroLIA Gerät führen. Ebenso sollte die bauartbedingte Übersprechung („Cross-talk“) des Gerätes nicht wesentlich größer sein als die des CentroLIAs.

Bezüglich der Lumineszenzmessung ist zu beachten, dass das Infinite eine klar vorgegebene Messrichtung, zeilenweise mäanderförmig, besitzt welche nicht variiert werden kann. Dies unterscheidet sich zur Referenzmethode. Hier erfolgen die Pipettierung der Reagenzien und die Messung in Übereinstimmung spaltenweise. Dies könnte eine Ursache für beobachtbare Unterschiede in der Konzentrationsermittlung zwischen den beiden Geräten sein. Außerdem ist das CentroLIA im Gegensatz zum Infinite variabel in der Messrichtung einstellbar.

Es zeigte sich bei der Cross Talk Testung, dass die Variante 200 ms Integrationszeit, automatische Filterabschwächung, beim Infinite zu einer großen Übereinstimmung mit den CentroLIA Werten führt und diese Integrationszeit wurde standardmäßig in den nachfolgenden Messreihen verwendet. Es wurden bei allen getesteten Varianten der Integrationszeit keine signifikanten Effekte an Überstrahlung oder Drifteffekten registriert, jedoch war ein Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Standardreihe zu bemerken, mit der minimalsten Abweichung zu Referenz bei 200 ms

Integrationszeit.

Bei der Intra-Plattenpräzisionstestung gab es keine Auffälligkeiten, es werden hinsichtlich der Variationskoeffizienten, Randeffekte sowie der Betrachtung innerer zu äußerer Bereich der Platte von beiden Geräten ähnliche Ergebnisse erzielt. Alle Assays mit Ausnahme des Estradiol Assays mit Standard G zeigten einen Intra Variationskoeffizient von $< 6\%$ und liegen damit unterhalb des Schwellenwertes der Vorgabe aus den Kriterien der Qualitätskontrolle für eine Mikrotiterplatten-In-Prozess-Kontrolle (IPC). Es wird generell bei den Platten-IPC-Messungen als Probe für die Präzisionstestung eine Probe gewählt, die im linearen Konzentrationsbereich der Standardkurve mit einem für den jeweiligen Test mittleren Signal liegt. Bei der hier vorliegenden Testung wurden bewusst Proben im oberen bzw. unteren Signalbereich gewählt, um die Prozessgrenzen beurteilen zu können. Außerdem zeigte der Infinite in dem Estradiol-Assay einen geringeren Platten-CV als das Referenzgerät Centro-LIA. Insgesamt jedoch lässt sich kein signifikanter Unterschied (Student's T-test, t-Statistik: -0.39, 5 Freiheitsgrade, $p= 0.7133$) zwischen beiden Geräten hinsichtlich der gemessenen Plattenpräzision, siehe nachfolgende Tabelle 22, ermitteln.

Tabelle 22: statistische Daten.

	N	Mittelwert	Median	Standardfehler (SE)	Standardabweichung (STD)
Centro-LIA (CV%)	6	4.37	3.95	0.915	2.24
Infinite (CV%)	6	4.27	4.15	0.657	1.61

Hinsichtlich der Driftüberprüfung in Bezug auf die Standardkurvenanordnung lassen sich keine signifikanten Drift- oder positionsbedingten Effekte zwischen den Geräten feststellen. Die ermittelten Differenzen der prozentualen Abweichungen der Konzentrationsermittlungen waren für alle Assays, mit Ausnahme des LCL Assays $< 5\%$. Bei dem LCL lag der Variationskoeffizient $< 7\%$. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der LCL-Assay das geringste Pipettiervolumen für die jeweiligen Proben besitzt und es damit zu höheren Schwankungen aufgrund von Pipettierungenauigkeiten kommen kann. Eine Konzentrationsdrift zwischen Beginn und Ende der Mikrotiterplatte konnte für alle Assays nicht detektiert werden. Die Messgeräte verhalten sich somit ähnlich und es sind keine Unterschiede zu erkennen, außer dem Unterschied in der

bauartbedingten absoluten Signalthöhe (Infinite im Vergleich zum CentroLIA konstant deutlich tiefer (ca. 60-70% für Steroidassays und ca. 40% für IRT).

Bezüglich der Abweichungen zum Zielwert der gemessenen Konzentrationswerte zeigen die ermittelten Korrelationen, dass zwischen den beiden Geräten kein signifikanter Unterschied bezüglich der Messniveaus aller untersuchten Assays vorliegt und sich die Korrelationsparameter alle in den definierten Grenzen bewegen. Die Korrelationen zeigen, dass zwischen den beiden verglichenen Geräten keine Verschiebung des Messbereiches vorliegt.

In Bezug auf die Differenzierung von RLU zu RLU_{max} der Standardkurve wurde bei allen Testungen, mit Ausnahme für den DHEA- und den Estradiolassay, das Kriterium von <5% bezüglich der Abweichung voneinander eingehalten. Bei DHEA und beim Estradiol ist jeweils die Differenzierungsabweichung für die erste Standardreihe nicht im geforderten Kriterium von <5%. Bezogen auf die Konzentrationsermittlung verhalten sich beide Teste im Vergleich zwischen den Geräten jedoch ähnlich und zeigen keine signifikanten Unterschiede gegeneinander. Sind die Abweichungen in den prozentualen Bindungen zu hoch, kann dies unter Umständen noch über die Einstellung der Messzeit/Well des Infinite variiert werden. Dieser Sachverhalt muss weiterhin beobachtet werden und wird als geringe Abweichung zu der festgelegten Grenze bewertet.

Insgesamt haben wurden die während der OQ Phase erhobenen Resultate innerhalb der PQ Testungen bestätigt. Der Konzentrationsunterschied über alle Teste hinweg zwischen den Geräten liegt unter 5%. Beim DHEA und Estradiol Assay war die jeweilige Abweichung jedoch >5%. Ein Vergleich mit den während der OQ- Phase erhobenen Daten mit beiden Assays zeigten jedoch, dass hier wahrscheinlich Unterschiede in der Abarbeitung oder verschiedene Testchargen für die Unterschiede verantwortlich sind. Hinsichtlich des Messverhaltens der Geräte sind keine Unterschiede festzustellen. Beim DHEA Assay lagen die mit dem Infinite ermittelten Ergebnisse sogar näher am Mittelwert des Gesamtprobenbereichs. Da von den Steroidassays der Parameter Estradiol mit den geringsten Absolutsignalstärken gemessen wurde, könnte gegebenenfalls durch eine Signalanhebung oder -absenkung (mittels Enzymkonjugat) oder über eine Anpassung der Standardkurve (Verdünnen oder Aufkonzentrierung) eine mittigere Messung der jeweiligen Bereiche erreicht werden.

Die Korrelationsanalysen zur Charakterisierung des Messverhaltens und Messniveaus der Assays bestätigten ebenso das vergleichbare Verhalten der beiden Geräte. Bei allen durchgeführten Assays lag der Korrelationskoeffizient deutlich über 0.9.

Die Anforderungen bezüglich der Steigung ($0.8 < m < 1.2$) wurden mit Ausnahme der DHEA Assay Ansätze (0.72 und 0.77) und einem Estradiol Ansatz (0.68) eingehalten.

Zudem sind die Korrelationsermittlungen bei Progesteron durch die jeweils höchstkonzentrierte Qualitätskontroll-Probe und ihrer Varianz in der Konzentrationsermittlung dominiert. Eine Eliminierung in der Auswertung ergibt für beide Progesteronansätze der PQ-Phase eine Steigung >0.9 ($0.9488x + 5.27$; $0.9432x + 1.91$). Die ermittelte Steigung von <0.8 für einen der Estradiolansätze ist wahrscheinlich auch zurückzuführen auf Unterschiede in der Abarbeitung oder der Testchargen. Alle anderen Estradiolansätze, inklusive der OQ-Phase, ergaben Steigungen von >0.8 .

Bei den Testungen während der OQ-Phase wurden jedoch für beide Assays die jeweiligen Steigungen der Korrelationsanalysen innerhalb der Schwellengrenzen gefunden. Somit ist davon auszugehen, dass dies auf die oben erwähnten Ansatzunterschiede zurückzuführen ist.

Die registrierten Abweichungen bezüglich der DHEA und Estradiol Assays sollten jedoch weiter beobachtet werden um eine eventuelle Systematik zu erkennen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind die Überschreitungen der jeweiligen Schwellenwerte aber nicht eindeutig auf die jeweils verwendeten Luminometer zurückzuführen.

Da bei allen untersuchten Assays eine weitgehende Übereinstimmung in den ermittelten Daten und Resultaten zu verzeichnen ist, kann von einer vergleichbaren Funktionalität für das Infinite zum bisherigen Referenzgerät CentroLIA ausgegangen werden. Damit ist auch das Infinite M200 Luminometer zur Analyse und Charakterisierung von Lumineszenztesten innerhalb von Inprozess- und Freigabekontrollen einsetzbar.

Sowohl die Konzentrationen der Kontrollen als auch der verwendeten QC-Probenpanels wurden in großer Übereinstimmung mit beiden Geräten in ihren individuellen, definierten Bereichen gefunden.

Die Einführung als Referenzgerät sollte es ermöglichen, eine bessere Abstimmung zwischen Assay und Gerät zu erreichen und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung mit Geräten beim Kunden zu erreichen.

Perspektivisch ist jedoch ein erhöhtes Augenmerk in Bezug auf das tiefere Messsignal sowie die zu verwendenden Auswertalgorithmen mit Magellan zu legen, da diese zu

unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Eine Erhöhung der Signalstärke für einzelne Assays bzw. die Festlegung von bestimmten Algorithmen für eine Auswertesoftware könnte hier noch zu einer weiteren Optimierung führen.

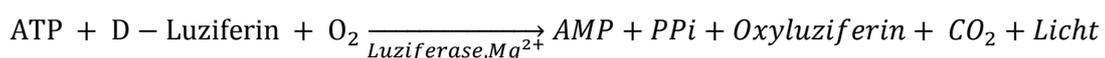
Außerdem ergibt sich eventuell ein erhöhter Schulungsbedarf der Mitarbeiter für die Verwendung der Magellan-Software für das Infinite M200, da diese sich zur bisher verwendeten MikroWin Software unterscheidet.

Ein potentieller Vorteil gegenüber dem CentroLIA Gerät ist die Möglichkeit, das Infinite Luminometer Gerät in Tecan Pipettierstationen zu integrieren um eine vollautomatisierte Abarbeitung der IBL-Lumineszenzteste zu ermöglichen.

Auf dem Markt ist eine Vielzahl an Luminometern vorhanden. Der Trend geht hin zu sogenannten Multi-Mode Readern. Hiermit kann mithilfe eines einzigen Gerätes ein größerer Anwendungsbereich, zum Beispiel die Messung von Lumineszenz, Absorption, Fluoreszenz u.a. abgedeckt werden. Dies bietet den Nutzern mehrere Vorteile, so muss nur ein einzelnes Gerät angeschafft werden und nicht mehrere verschiedene. Außerdem muss so nur ein einzelnes Gerät regelmäßig gewartet werden anstatt vieler verschiedener. Dies spart Zeit und Personalkosten. Nicht zuletzt ergibt sich durch Anwendung eines Multi-Mode Readers ein Platzvorteil. Die Entwicklung von Luminometern ist heutzutage immer mehr darauf ausgerichtet, in Automatisierungsanlagen eingebunden werden zu können. Ebenso besteht häufig die Möglichkeit, Luminometer mit Stapleinheiten (Stacker-Anlagen) zu kombinieren. In einer Marktübersicht der Zeitschrift Biospektrum von Oktober 2014 für Mikrotiterplatten Lesegeräte handelt es sich bei 18 von 32 vorgestellten Geräten um multifunktionale Geräte mit Detektionsfunktion für Lumineszenz. Das in dieser Arbeit validierte Luminometer Infinite M200 Pro ist in der Marktübersicht ebenso vertreten.

(30)

Die Bestimmung der Sensitivität von Luminometern erfolgt häufig mittels ATP-Messung. Die Lichtentstehung hierbei geht zurück auf die Reaktionsgleichung:



mit

ATP = Adenosintriphosphat

AMP = Adenosinmonophosphat

PPi = anorganisches Pyrophosphat

(21, 31)

Die hohe Sensitivität bei Luminometern wird ermöglicht durch die Verwendung von ausgewählten Hochleistungs Photomultiplier. Die Anwendung der Photonenzählmethode zeichnet sich als das stabilste und sensitivste Verfahren der Lumineszenzmessung aus. (1)

In der durchgeführten Validierung wurde unter Verwendung der optimalsten Einstellungen eine Sensitivität für glow Lumineszenz für das Infinite M200 Pro von 0.31 fmol/well (entspricht 310 amol/well) erzielt. Im Vergleich mit den Spezifikationsangaben verschiedener Hersteller für Luminometer ist dieser Wert zwar von den nachfolgend aufgelisteten am höchsten. Es ist aber dennoch bei einer so geringen Zahlendimension von $a = 10^{-18}$ davon auszugehen, dass es sich bei der erzielten Sensitivität um ein optimales Ergebnis handelt. Die nachfolgende Tabelle 23 zeigt Herstellerangaben für die Sensitivität verschiedener Luminometer.

Tabelle 23: Sensitivitäten verschiedener Luminometer, unterschieden in flash und glow Lumineszenz.

Gerätename	Hersteller	Sensitivität, amol ATP/well (flash)	Sensitivität, amol ATP/well (glow)
Infinite M200 Pro	Tecan Austria GmbH	12	169
Infinite M1000 Pro	Tecan Austria GmbH	12	225
Luminoskan Ascent	Thermo Scientific	10	-
Spark	Tecan Austria GmbH	10	149
Synergy NEO	BioTek	5	-

(31–35)

Es zeigt sich, dass die Sensitivität für die flash Lumineszenz geringer als für die glow Lumineszenz ist. Die Abweichung der ermittelten Sensitivität von 310 amol ATP/well zur Literaturangabe kann sich durch geringe Unterschiede in der Abarbeitung begründen. So ist zum Beispiel die Testung in einer 96-well statt 384-well Platte durchgeführt worden. Außerdem könnte die Umgebungstemperatur einen Einfluss auf die Luziferase Aktivität haben oder die Herstellung der ATP-Stocklösung könnte eine minimale Abweichung besitzen. Insgesamt sind die erhaltenen Ergebnisse als plausibel zu bewerten.

7. Zusammenfassung

Mit Hilfe eines Luminometers können Mikrotiterplatten gemessen werden, in denen ein Chemilumineszenz-Immunoassay durchgeführt wird. Diese Arten von Immunoassays werden genutzt, um zum Beispiel den Gehalt verschiedener Steroidhormone wie Testosteron, Progesteron, Cortisol u.a. im Saliva zu quantifizieren sowie zur Bestimmung von immunreaktiven Trypsin mit Blutfilterkarten.

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde innerhalb der Firma IBL International GmbH für ein Luminometer eine Prozessvalidierung durchgeführt. Hierbei sollte gezeigt werden, dass das zu validierende Mikrotiterplatten-Luminometer Infinite M200 PRO (Tecan GmbH) für die Messung der IBL-Lumineszenz-Teste geeignet ist. Als Referenzgerät kam das Luminometer CentroLIA (Berthold Technologies) zum Einsatz. Die für das Infinite Gerät zu verwendende Auswertesoftware Magellan (Tecan GmbH) wurde ebenso bei der Validierung betrachtet.

Die Prozessvalidierung wurde entsprechend den Vorgaben der FDA Guideline 21 Part CFR Part 820 Section 820.3 (z)(1) durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Einteilung in die Phasen Designqualifizierung, Installationsqualifizierung, Funktionsqualifizierung und Leistungsqualifizierung. Es erfolgte die Bestimmung der Sensitivität des Luminometers mittels eines ATP-Testes. Das Übersprechungsverhalten wurde untersucht. Außerdem wurden Intra-Plattenpräzisionstestungen durchgeführt. Für die zu betrachtenden Lumineszenzassays wurden Korrelationen der ermittelten Konzentrationswerte für Qualitätskontrollproben im Vergleich zur Messung mit dem Referenzluminometer erstellt.

Bei allen durchgeführten Prüfungen ist eine weitestgehende Übereinstimmung in den ermittelten Daten und Resultaten zu dem Referenzgerät sowie zu den vorher definierten Kriterien zu verzeichnen. Daher kann von einer vergleichbaren Funktionalität für das Infinite zum bisherigen Referenzgerät CentroLIA ausgegangen werden. Damit ist das Infinite M200 Luminometer zur Analyse und Charakterisierung von Lumineszenztesten einsetzbar.

8. Literaturverzeichnis

Literature Cited

1. Berthold F, Tarkkanen V. Luminometer development in the last four decades: recollections of two entrepreneurs. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence* 2013; 28(1):1–6.
2. Rana SVS. *Biotechniques: Theory & practice*. 2nd ed. Meerut, India: Rastogi Publications; 2008-2009.
3. Abelson JN, Simon MI, Ziegler MM, Baldwin TO. *Bioluminescence and Chemiluminescence, Part C. 1. Aufl. s.l.: Elsevier textbooks; 2000. (Methods in enzymologyv. 305)*. Available from: URL:<http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10180372>.
4. Tecan Austria GmbH. *Gebrauchsanweisung für das Infinite 200 PRO: Document Part. No.: 30054316 2014-06 [Document Revision No.: 1.5]*.
5. Scott D, Dikici E, Ensor M, Daunert S. Bioluminescence and its impact on bioanalysis. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)* 2011; 4:297–319.
6. Miska W, Geiger R. Luciferin derivatives in bioluminescence-enhanced enzyme immunoassays. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* 1989; 4(1):119–28.
7. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie. 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014*. Berlin: Springer Spektrum; 2014. (Experimentator). Available from: URL:<http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>.
8. IBL International GmbH. *Arbeitsanleitung für Cortisol Saliva Lumineszenz Immunoassay: Katalognummer RE62011+RE62019 [Version 2015-01]*.
9. IBL International GmbH. *Arbeitsanleitung für DHEA Lumineszenz Immunoassay: Katalognummer RE62051+RE62059 [Version 2015-01]*.
10. Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2015; 173(2):D1-12.
11. Holst JP, Soldin OP, Guo T, Soldin SJ. Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. *Clinics in laboratory medicine* 2004; 24(1):105–18.
12. Greaves RF, Jevalikar G, Hewitt JK, Zacharin MR. A guide to understanding the steroid pathway: new insights and diagnostic implications. *Clinical biochemistry* 2014; 47(15):5–15.
13. Gatti R, Palo EF de. An update: salivary hormones and physical exercise. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 2011; 21(2):157–69.
14. Harer J. *Anforderungen an Medizinprodukte: Praxisleitfaden für Hersteller und Zulieferer. [Elektronische Ressource]*. München: Hanser; 2013. Available from: URL:<http://www.hanser-elibrary.com/action/showBook?doi=10.3139/9783446432901>.
15. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *21 Code of Federal Regulations Part 820, Quality System Regulation, Medical Devices; 2015 2015 Apr 1*.

16. Chakarvarty G, Seth N, Sharma V. Process Validation of solid oral dosage form and process validation guidance for industry. *Int. Res. J. Pharm.* 2013; 4(5):36–9.
17. Kutz G, Wolff A, editors. *Pharmazeutische Produkte und Verfahren*. Weinheim: Wiley-VCH; 2007. Available from:
URL:<http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10301943>.
18. SG3. *Quality Management Systems - Process Validation Guidance: The Global Harmonisation Task Force - Final Document*. Edition 2; 2004.
19. Burgess C. Approaches to the validation of spectrophotometers. In: *Spectrophotometry, Luminescence and Colour; Science & Compliance, Papers presented at the second joint meeting of the UV Spectrometry Group of the UK and the Council for Optical Radiation Measurements of the USA*: Elsevier; 1995. p. 21–34 (Analytical Spectroscopy Library).
20. Tecan Austria GmbH. *Gebrauchsanweisung für die Magellan Software: Document Part. No.: 30066407 2013-08 [Document Revision No.: 1.3]*.
21. BioThema AB. *ATP Kit SL Article No. 144-041: Gebrauchsanweisung*; 2008.
22. Tecan Austria GmbH. *Gebrauchsanweisung für MultiCheck Infinite 200 PRO Series: Document Part. No.: 30054115 2014-09 [Document Revision No.: 1.4]*.
23. Bio-Rad Laboratories I. *Bio-Plex™ suspension array-system: Principles of Curve Fitting for Multiplex Sandwich Immunoassays [Technical Note]*; 2007.
24. Mikrotek Laborsysteme GmbH. *Benutzerhandbuch für MikroWin 2000: Version 4 [August 2008]*.
25. Price CP, Newman DJ, editors. *Principles and practice of immunoassay*. 2. ed. Basingstoke: Macmillan; 1997.
26. Vector Laboratories. *DuoLux Chemiluminescent/Fluorescent Substrate: Gebrauchsanweisung [Version DLX-HRP-11/09]*.
27. Sastri VR. *Process Validation for Medical Device Manufacturers and Their Suppliers*. In: *Plastics in Medical Devices*: Elsevier; 2014. p. 279–94 .
28. Haeckel R, Wosniok W, Klauke R. Comparison of ordinary linear regression, orthogonal regression, standardized principal component analysis, Deming and Passing-Bablok approach for method validation in laboratory medicine. *Laboratoriumsmedizin* 2013; 37(3).
29. Wild D, editor. *The immunoassay handbook*. 2. ed. London: Nature Publ. Group; 2001.
30. Springer Spektrum. *Biospektrum: Das Magazin für Biowissenschaften*. *Biospektrum* Oktober 2014:658–70.
31. Thermo Scientific. *Sensitivity of Thermo Scientific Lumikoskan Ascent and Fluoroskan Ascent FL in flash type ATP assay [Application Note]*; 2007.
32. Tecan Trading AG. *Spark™ 10M multimode reader - luminescence sensitivity: Optimizing the detection limits for flash and glow luminescence [Technical Note]*; 2015.
33. BioTek Instruments. *Synergy TM NEO HTS Multi-Mode Microplate Reader: Application Note*; 2012.

34. Tecan Trading AG. Infinite® M1000 PRO - a future-proof multimode reader with AlphaScreen® and AlphaLISA® technology: Top class monochromator-based microplate reader offering outstanding performance for demanding applications in drug discovery and life science research [Produktbrüschüre]; 2012.

35. Tecan Trading AG. Infinite® 200 PRO - luminescence sensitivity: Optimizing the luminescence sensitivity in the Infinite 200 PRO multimode reader series [Technical Note]; 2010.