

Entwicklung von Antikörper-basierten Tests zum  
quantitativen Nachweis von Antibiotika in Serum  
und Plasma

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer.nat.)

des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von  
M.Sc. Friederike Buschfort  
aus Bocholt

Marburg, 2023

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der  
Philipps-Universität Marburg  
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer  
Creative Commons

Namensnennung-Nicht kommerziell-Keine Bearbeitungen 4.0 International

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode.de>

Die Arbeit zur vorliegenden Dissertation wurde von August 2019 bis Juni 2023 in der Firma DRG Instruments GmbH in Marburg unter der Betreuung von Dr. Matthias Herkert angefertigt. Die Betreuung an der Phillips-Universität Marburg wurde im Fachbereich Biologie in der Arbeitsgruppe molekulare Zoologie von Prof. Dr. Monika Hassel übernommen.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation  
angenommen am \_\_\_\_\_

Erstgutachter: Prof. Dr. Monika Hassel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christian Helker

Tag der Disputation: \_\_\_\_\_

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Entwicklung von Antikörper-basierten Tests zum quantitativen Nachweis von Antibiotika in Serum und Plasma“ selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 06.06.2023

Friederike Buschfort

**Statement on the contribution to publications in this dissertation**

I declare that this thesis was composed by myself and without external assistance. I confirm that the work presented has not been submitted for any other degree or professional qualification. I also declare that I have not made any prior doctoral attempt.

Furthermore, I confirm that no sources other than those indicated have been used and that appropriate credit has been given within this thesis where reference has been made the work of others.

I confirm that the work submitted is my own, except where explicitly stated otherwise in the text or where work that has formed part of jointly-authored publications has been included. My contribution to this work has been explicitly stated below.

Marburg, June 6th, 2023

Friederike Buschfort

*Man merkt nie, was schon getan wurde,  
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.*

*Marie Curie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Summary .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
3.1 Antibiotika .....	3
3.2 Klassifizierung der Antibiotika.....	4
3.2.1 Klassifizierung der Antibiotika nach Wirkmechanismus .....	4
3.2.2 Ceftazidim .....	8
3.2.3 Linezolid.....	8
3.3 Antibiotika Resistenzen .....	9
3.4 Therapeutisches Drug Monitoring .....	11
3.5 Antibiotic Stewardship (ABS).....	13
3.6 Das Immunsystem .....	14
3.7 Hybridom-Technik.....	16
3.8 Immunoassay .....	17
3.9 DRG:HYBRiD-XL® .....	19
3.10 Auswertung der optischen Dichte mittels Standardkurve.....	21
3.11 Testentwicklungsphasen für die Neuentwicklung von Assays in der DRG Instruments GmbH	
22	
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
4.1 Material .....	25
4.1.1 Antibiotika .....	25
4.1.2 Chemikalien .....	26
4.1.3 Puffer .....	27
4.1.3.1 Standardmatrix .....	29
4.1.4 Antikörper .....	29
4.2 Methoden.....	32
4.2.1 Antigen-Design .....	32
4.2.2 Antigen-Kopplung an Trägerproteine .....	32
4.2.3 Immunisierung .....	32
4.2.4 Fusion .....	34
4.2.5 Screening.....	34
4.2.5.1 Screening SynABs.....	34

4.2.5.2	Screening DRG Instruments GmbH .....	35
4.2.5.3	Bestimmung der Isotypen der ausgewählten Antikörper für Cefprozid und Linezolid .....	37
4.2.6	Protein A/G Aufreinigung .....	38
4.2.7	Konjugation von Antikörper an HRP .....	39
4.2.8	Vorversuche zur Testentwicklung.....	40
4.2.8.1	Beschichtung der Mikrotiterplatten .....	40
4.2.8.2	Testkomponenten .....	41
4.2.8.3	Testablauf .....	43
4.2.9	Vorversuche zur Adaptierung auf den DRG:HYBRiD-XL® .....	44
4.2.10	Produktion von Prototypen .....	47
4.2.10.1	Erstellung der Mastercurve .....	47
4.2.10.2	Qualitätskontrolle der Plattenbeschichtung .....	47
4.2.10.3	Funktionelle Qualitätskontrolle .....	48
4.2.11	Technische Dokumentation .....	48
4.2.12	Verifizierung.....	49
4.2.12.1	Bestimmung der analytischen Spezifität.....	49
4.2.12.2	Bestimmung des Limit of Blank .....	49
4.2.12.3	Bestimmung der analytischen und funktionellen Sensitivität.....	49
4.2.12.4	Ermittlung der Richtigkeit (Traceability).....	50
4.2.12.5	Präzision .....	50
4.2.12.6	Wiederfindung (Recovery) .....	51
4.2.12.7	Linearität .....	52
4.2.12.8	Matrix-Interferenz.....	52
4.2.12.9	Bestimmung des Probenotyps (Sample Collection) .....	54
4.2.12.10	Stabilitätsprüfung .....	54
4.2.13	Validierung.....	56
4.2.13.1	Bestimmung von Referenzwerten mit Proben gesunder Individuen .....	56
4.2.13.2	Methodenvergleich .....	56
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>57</b>
5.1	Antigen Design .....	57
5.2	Immunisierung .....	57
5.3	Fusion .....	60
5.3.1	Screening der Klone .....	60
5.3.1.1	Screening der Klone für Cefprozid .....	60
5.3.1.2	Screening der Klone für Linezolid.....	64
5.3.1.3	Bestimmung der Isotypen der ausgewählten Antikörper für Cefprozid und Linezolid	66
5.4	Austesten des Testformats .....	67
5.4.1	Austesten des Testformats für Cefprozid.....	67
5.4.1.1	Testsystem 1: Antibiotikum- HRP- Format .....	67
5.4.1.2	Testsystem 2: Antikörper- HRP Konjugat Format .....	79



5.4.1.3	Optimierung des Testsystems .....	79
5.4.2	Austesten des Testformats für Linezolid .....	82
5.4.2.1	Testsystem 1: Antibiotikum-HRP – Format .....	82
5.4.2.2	Testsystem 2: Antikörper-HRP– Konjugat Format- .....	83
5.4.2.3	Stabilitätsprüfung der Einzelkomponenten .....	86
5.5	Transfer des manuellen Protokolls auf den Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL (Adaptierung)...	89
5.5.1	Adaptierung des Ceftazidim ELISAs .....	89
5.5.2	Adaptierung des Linezolid ELISAs .....	95
5.6	Produktion von Prototyp- Chargen .....	100
5.6.1	Qualitätskontrolle des 1. Funktionsmusters (Prototyp 1).....	100
5.6.1.1	Plattenhomogenität .....	100
5.6.1.2	Erstellung der Mastercurve .....	101
5.6.1.3	Funktionelle Qualitätskontrolle .....	102
5.7	Technische Dokumentation – Verifizierung .....	104
5.7.1	Bestimmung des Probenotyps (Sample Collection) .....	104
5.7.2	Bestimmung des Limit of Blanks .....	105
5.7.3	Bestimmung der analytischen und funktionellen Sensitivität .....	106
5.7.4	Präzision .....	108
5.7.5	Überprüfung der Richtigkeit der Messung .....	112
5.7.6	Linearität .....	117
5.7.7	Wiederfindung von gespikten Proben.....	125
5.7.8	Stabilitätsprüfung .....	126
5.7.8.1	Stabilitätsprüfung der Kontrollen und Rekalibratoren .....	127
5.7.8.2	Stabilitätsprüfung der Reagenz- Cartridges .....	128
5.7.8.3	Stabilitätsprüfung des gesamten Kits bei Raumtemperatur .....	130
5.7.8.4	On-Board-Stabilität der Rekalibratoren und Kontrollen .....	131
5.7.8.5	Stabilitätsprüfung nach Transportsimulation .....	132
5.8	Validierung .....	134
5.8.1	Bestimmung von Referenzwerten mit Proben gesunder Individuen .....	134
5.8.2	Methodenvergleich .....	137
<b>6</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>146</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: schematische Darstellung der Resistenzmechanismen von Bakterien gegen Antibiotika. Das Antibiotikum dargestellt in blau, wird auf verschiedene Weise daran gehindert seinen Angriffspunkt (grau) zu erreichen. ....	10
Tabelle 2: verwendete Antibiotika mit Lieferanten, CAS-Nummer und Bestellnummer. Die CAS-Nummer ist die Registrierungsnummer und internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe. ....	25
Tabelle 3: verwendete Chemikalien mit Lieferanten, CAS-Nummer und Bestellnummer. Die CAS-Nummer ist die Registrierungsnummer und internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe. ....	26
Tabelle 4: Puffer mit verschiedenen Anwendungsgebieten der Firma CANDOR Bioscience mit Bestellnummer und wichtigen Nutzungshinweisen. ....	27
Tabelle 5: Zellkulturüberstände von verschiedenen Klonen Maus anti- Ceftazidim. Abnahmedatum 04.03.20.....	30
Tabelle 6: Zellkulturüberstände von verschiedenen Klonen Maus anti-Linezolid. Abnahmedatum 04.03.20.....	30
Tabelle 7: Sekundäre Antikörper zur Isotopen Analyse der Antikörperklone. Hergestellt von der Firma SynAbs .....	31
Tabelle 8: Immunisierungsprotokoll für die Balb-C Mäuse. Immunisierung mit BSA-Linezolid/ Ceftazidim und KLH- Ceftazidim und Linezolid. ....	32
Tabelle 9: Ablaufschema der ersten Testung der Antiseren aus den Immunisierten Mäusen und Ratten bei der Firma SynAbs. ....	33
Tabelle 10: Ablaufschema der Beschichtung der Platten für das Screening der Zellkulturüberstände für anti-Linezolid/anti-Ceftazidim bei DRG Instruments GmbH. ....	35
Tabelle 11: Durchführungsprotokoll der ELISAs der Screening Versuche. Gezeigt ist das Protokoll für den direkten ELISA ohne Konkurrenz und dem Kompetitiven Format mit freiem Antibiotikum. ....	36
Tabelle 12: Schema der Arbeitsschritte der Plattenbeschichtung.....	41
Tabelle 13: Vergleich der Durchführung des Ceftazidim Assays manuell und auf dem Vollautomaten. ....	44
Tabelle 14: Beispiel zur Herstellung der Aufstocklösungen A-D.....	51
Tabelle 15: Beispiel zur Durchführung des Versuchs zur Wiederfindung mit Ermittlung der Wiederfindung (%).....	52
Tabelle 16: Verdünnungsreihen der Substanzen für den Versuch Matrix Interferenz. Angegeben sind Konzentration der Stocklösung (fett), sowie die Konzentration der mit PBS verdünnten Lösungen(kursiv) in mg/mL.....	52
Tabelle 17: Auswertung der Verdünnungsreihen des Serums des first bleeds der mit den Carrierprotein-Antibiotika Konjugaten immunisierten Mäuse. Als Testantigen wurde für die BSA-Antibiotika immunisierten Mäuse ein KLH-Antibiotika Konjugat verwendet für die KLH-Antibiotika ein BSA-Konjugat. Die Verdünnung wurde von 1:500 bis 1:6400 durchgeführt. Die OD wurde bei 450 nm gemessen. ....	58

Tabelle 18: a) 1. Screening der Klone in Verdünnungsreihen bis zu 1:1600 auf Ceftazidim-BSA (1µg/mL) beschichteten Platten. Blaue Farbe verdeutlicht die Stärke des gefundenen Signals. b) eingesetzte Verdünnung für das 2. Screening der Klone. ....	61
Tabelle 19: Kompetitionskurven beispielhaft für verschiedene Klone für Linezolid, aufgeteilt in drei Kategorien. Dargestellt ist die OD bei 450 nm/620 nm bei einer zunehmenden Konzentration von Linezolid von 0-500 ng/mL. ....	65
Tabelle 20: Messung der EUREKA Kalibratoren mit den zuvor ausgewählten Klonen 17, 18 und 21 gegen Linezolid. ....	66
Tabelle 21: Isotypen-Bestimmung für Ceftazidim Klone CL29 und CL40.....	66
Tabelle 22 Isotypen Bestimmung für Linezolid Klone CL18 und CL21 .....	67
Tabelle 23: Spezifikationen der Standardkurven in Abhängigkeit des zur Beschichtung genutzten Antikörper. ....	69
Tabelle 24: Prozentuale OD-Abnahme im Vergleich zum Nullstandard (OD <sub>max</sub> ) in Abhängigkeit der verschiedenen Plattenbeschichtungs-Konzentrationen. Als Probe wurde eine Standardreihe aus freiem Ceftazidim in ng/mL verwendet. ....	71
Tabelle 25: Einfluss der Konjugatkonzentration auf die Standardkurven auf einer Platte mit 2 µg/mL. Gezeigt sind die realen ODs und die Ratios (%) zu OD <sub>max</sub> . ....	73
Tabelle 26: Ceftazidim-Standard Material Stabilitätsprüfung in folgenden Puffern, mit angegebenen pH-Werten. ....	75
Tabelle 27: Einfluss der Konzentration des Beschichtungsantikörpers auf die Ratios (%) der Standardkurve. ....	82
Tabelle 28: Stabilität des anti- Linezolid CL18-HRP Konjugats nach 12 Tagen bei 4°C und 40°C in verschiedenen Puffern.....	87
Tabelle 29: Einfluss des Konjugatpuffers auf den Kurvenverlauf. Gezeigt sind die Puffer Stabilzyme HRP 1:2 H <sub>2</sub> O, HRP Protector und Tracer HRP Stabilizer. Die Konjugatkonzentration war in allen Fällen 30 ng/mL.....	88
Tabelle 30: Vergleichende Darstellung der Standardkurven und der Kurvenspezifikationen bei Änderung der Inkubationstemperatur von Raumtemperatur auf 37°C. Die Messung erfolge bei 450nm. ....	90
Tabelle 31: Messung der EUREKA Kit Kontrollen mit Konfiguration 1 und 2. ....	93
Tabelle 32: Optimierte Standardisierung des Ceftazidim- Assays für den Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL . ....	94
Tabelle 33: Auswertung der Ergebnisse der funktionellen Qualitätskontrolle des Prototyp 1 457K031-1 für den Parameter Ceftazidim.....	102
Tabelle 34: Auswertung der Ergebnisse der funktionellen Qualitätskontrolle des Prototyp 1 459K071-1 für den Parameter Linezolid. ....	103
Tabelle 35: Zusammenfassung der Ergebnisse der Sample Collection für den Ceftazidim Assay. Es wurden gespikte Serum und Plasmaproben gemessen. Die Wiederfindung der Plasma Proben wurde zum im Serum ermittelten Wert berechnet. Zur Messung wurde die Lot 457K031- 1 verwendet. ....	104

Tabelle 36: Sample Collection für den Linezolid Assay. Es wurden gespikte Serum und Plasmaproben gemessen. Die Wiederfindung der Plasma Proben zu im Serum ermittelten Wert. Die grau hinterlegten Werte sind außerhalb der Akzeptanzkriterien zu finden. ....	105
Tabelle 37: Within- Run Präzision des Ceftazidim Assays. ....	108
Tabelle 38: Between- Run-Präzision des Ceftazidim Assays. ....	109
Tabelle 39: Between-Device – Präzision des Ceftazidim Assays. ....	109
Tabelle 40: Within-Run Präzision des Linezolid Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL. ....	110
Tabelle 41: Between-Run Präzision des Linezolid Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL. ....	111
Tabelle 42: Between-Device Präzision des Linezolid Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL. ....	111
Tabelle 43: Richtigkeit des Ceftazidim Assays. Die Messung erfolgte mit den DRG:HYBRiD-XL. Die verwendeten Proben sind unter der Bestellnummer LC79016 erhältlich. ....	112
Tabelle 44: Richtigkeit des Linezolid Assays. Die Messung erfolgte mit den DRG:HYBRiD-XL. Verwendete Kalibratoren des EUREKA Kits LC79016. ....	115
Tabelle 45: lineare Verdünnung von vier Serum und Plasma Proben mit dem Ceftazidim Assay auf DRG:HYBRiD-XL-XL. Die Verdünnung wurde von 1:2 bis 1:16 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die automatische 1:100 Verdünnung wurde auf dem Gerät durchgeführt. Zusätzlich ist die Wiederfindung (%) zum erwarteten Zielwert angegeben. Grau unterlegte Messungen liegen unter dem LOQ (5.7.3). ....	117
Tabelle 46: Linearität bei kleinschrittiger Verdünnung einer Serumprobe mit dem Ceftazidim Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL. Die Verdünnung wurde von 1:1,25 bis 1:2 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die 1:100 Verdünnung der Proben wurde automatisch auf dem Gerät durchgeführt. .	119
Tabelle 47: Verdünnung einer Probe $20 \times S_{max}$ . Die Verdünnung wurde von 1:2 bis 1:1024 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die 1:100 Verdünnung der Proben wurde automatisch auf dem Gerät durchgeführt. ....	119
Tabelle 48: Lineare Verdünnung von vier Serum und Plasma Proben mit dem Linezolid Assay auf DRG:HYBRiD-XL-XL. Die Verdünnung wurde von 1:2 bis 1:16 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die 1:10 Vorverdünnung der Proben wurde auf dem Gerät durchgeführt. Die grau hinterlegten Felder erfüllen nicht das vorgegebene Akzeptanzkriterium von $\pm 15\%$ . ....	121
Tabelle 49: Ergänzende Prüfung der Linearität für Citrat-Plasma Proben mit dem Linezolid-Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL. ....	123
Tabelle 50: Ergebnisse der kleinschrittigen Verdünnung einer Serumprobe mit Probenverdünnungspuffer von 1:1,25 -1:2 mit dem Linezolid-Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL. ....	123
Tabelle 51: Verdünnung einer Probe die $20 \times S_{max}$ ist. Die Verdünnung wurde von 1:2 bis 1:2048 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die 1:10 Vorverdünnung erfolgt automatisch auf dem Gerät. ....	124
Tabelle 52: Übersicht der Ergebnisse für die Wiederfindung von dotierten Proben verschiedener Probentypen mit dem Ceftazidim- Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL. Der Probentyp sowie die ermittelte Konzentration und die erwartete Konzentration in ng/mL sind dargestellt. Zusätzlich ist die Wiederfindung (%) zum erwarteten Zielwert angegeben. ....	125
Tabelle 53: Wiederfindung von dotierten Proben verschiedener Probentypen mit dem Linezolid- Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL. Der Probentyp sowie die ermittelte Konzentration und die erwartete	

Konzentration in ng/mL sind dargestellt. Zusätzlich ist die Wiederfindung (%) zum erwarteten Zielwert angegeben.....	126
Tabelle 54: Stabilitätsprüfung von lyophilisierten Ceftazidim-Rekalibratoren in Standardmatrix (4.1.3.1). .....	127
Tabelle 55: Stabilitätsprüfung von rekonstituierten Ceftazidim-Rekalibratoren in Standardmatrix (3.1.3.1) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. ....	127
Tabelle 56: Stabilitätsprüfung von ready-to-use Linezolid-Rekalibratoren in Standardmatrix (4.1.3.1). .....	128
Tabelle 57: Stabilitätsprüfung der Cartridges von Ceftazidim. Lagerung bei 4°C und 40°C über 7 Tage. .....	128
Tabelle 58: Stabilitätsprüfung der Cartridges von Linezolid nach 7 Tagen bei 40°C. Als Referenz wird die Messung des Tag 0 herangezogen. ....	129
Tabelle 59: Stabilitätsprüfung des Ceftazidim Assays bei Raumtemperatur. Grau hinterlegte Felder weisen auf ein nicht bestehen der Akzeptanzkriterien hin. ....	130
Tabelle 60: Ergebnisse der Stabilitätsprüfung des Linezolid Assays bei Raumtemperatur. Gezeigt ist die Messung an Tag 0, sowie die Messung an Tag 21. Durchgeführt wurde die Messung am DRG:HYBRID-XL. ....	131
Tabelle 61: Ergebnisse der Stabilitätsprüfung der Lagerung der Rekalibratoren und Kontrollen des Ceftazidim Assays im Gerät für 48h. ....	132
Tabelle 62: Stabilitätsprüfung der Lagerung der Rekalibratoren und Kontrollen des Linezolid Assays im Gerät für 48h.....	132
Tabelle 63: Transportstabilität des Ceftazidim-Kits direkt nach der Transportsimulation und der Lagerung weiterer 12 Monate.....	133
Tabelle 64: Ergebnisse der Messung der Stabilität des Linezolid-Kits direkt nach der Transportsimulation und der Lagerung weiterer 12 Monate. Messung erfolgte mit dem DRG:HYBRID-XL .....	134
Tabelle 65: Messung von 75 Proben von Gesundspendern (männlich und weiblich) mit dem Ceftazidim-Assay auf dem Hybrid nach manueller Vorverdünnung der Probe. ....	135
Tabelle 66 Messung von 75 Proben von Gesundspendern (männlich und weiblich) mit dem Linezolid-Assay auf dem Hybrid nach manueller Vorverdünnung der Probe. ....	136
Tabelle 67: Vergleich der Sensitivität der Messung der LC-MS und der Methode auf dem DRG:HYBRID-XL in ng/mL.....	144

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bakterienzelle (schematisch) mit Angabe der Angriffspunkte und Mechanismen verschiedener Antibiotika. ( <a href="https://www.thieme.de/de/pflegepaedagogik/6-infektiologie-151808.htm">https://www.thieme.de/de/pflegepaedagogik/6-infektiologie-151808.htm</a> ) ..	5
Abbildung 2: schematische Darstellung der prokaryotischen Proteinbiosynthese. Verändert nach: <a href="https://i.stack.imgur.com/YJL3J.gif">https://i.stack.imgur.com/YJL3J.gif</a> .....	6
Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der Untergruppen der beta- Lactam Antibiotika. Zusätzlich ist der beta- Lactam- Ring gesondert dargestellt. ....	7
Abbildung 4: Vergleichende Darstellung der Antibiotika in der Gruppe der Oxazolidinone. Zusätzlich ist die strukturelle Gemeinsamkeit das 2-Oxazolidinon dargestellt. ....	7
Abbildung 5: schematische Darstellung der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen in verschiedenen Bereichen des alltäglichen Lebens. Quelle: <a href="https://www.helmholtz-hzi.de/de/aktuelles/thema/weltantibiotikawoche-2019/">https://www.helmholtz-hzi.de/de/aktuelles/thema/weltantibiotikawoche-2019/</a> .....	11
Abbildung 6: Plasmakonzentration in Abhängigkeit zur Zeit (t). Gezeigt ist die Wirkungsdauer des Antibiotikums im therapeutischen Konzentrationsbereich. Quelle: <a href="https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-45028-0_30-1">https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-45028-0_30-1</a> .....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Antikörpers. (Sadava et al., 2019) .....	15
Abbildung 8: schematische Darstellung der Hybridomtechnik zur Herstellung von Antikörpers aus Maus Milz-B-Lymphozyten. <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/s00347-010-2255-z#Fig1">https://link.springer.com/article/10.1007/s00347-010-2255-z#Fig1</a> .....	17
Abbildung 9: Mögliche Assayformate des ELISAs. Kompetitiver ELISA dargestellt in zwei Varianten. 1) Competition zwischen fester Phase und dem Standard. Antikörper in Lösung. 2) Competition in der flüssigen Phase. Antikörper ist an die feste Phase gebunden. 3) keine Competition um Bindung im Sandwich-ELISA Antikörper Paar auf der festen Phase und als Konjugat. Verändert nach: <a href="https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48986-4_1548">https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48986-4_1548</a> .....	18
Abbildung 10: Vergleichende Darstellung von Standardkurven eines kompetitiven und eines Sandwich Assays. (Luttmann et al., 2014) .....	19
Abbildung 11: Prozessübersicht der Neuentwicklung eines Assays für den Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL bei der DRG Instruments (DRG, 2018) .....	23
Abbildung 12: A: Linezolid mit Carbonylgruppe mit unreaktiver Amid Gruppe B: Linezolid Analogon: Linezolid related Compound C mit freier Amin Gruppe .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Abbildung 13: Schematische Darstellung der unterschiedlichen kompetitiven Testformate die in der Optimierung Anwendung finden. ....	42
Abbildung 14: schematische Darstellung der Schachbrettitration .....	42
Abbildung 15: Abarbeitung der Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL. (A) Ceftazidim (B) Linezolid. ....	46
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Lagerungsbedingungen eines Kits bei der Prüfung der Transportstabilität. ....	56
Abbildung 17: Screening der Immunisierung der Ratten mit BSA und KLH- Antibiotika Konjugaten. ..	57
Abbildung 18: Auswertung des Screenings der Mäuse an Tag 30. ....	59
Abbildung 19: Kompetitionskurven am Beispiel der verschiedenen Klone für Ceftazidim aufgeteilt in drei Kategorien. Dargestellt ist die OD bei 450 nm/630 nm bei einer zunehmenden Konzentration von Ceftazidim von 0-1000 ng/mL .....	63

Abbildung 20: Kompetitionskurven verschiedenener Klone bei Messung von plasmabasiertem Referenzmaterial (EUREKA) und Standardmaterial in Standardmatrix. ....	63
Abbildung 21: Screening der Klone in Verdünnungsreihen bis zu 1:500 auf Linezolid-BSA (1µg/mL) beschichteten Platten. ....	64
Abbildung 22: Testformat für Ceftazidim mit antikörperbeschichteter MTPL.....	68
Abbildung 23: Standardkurve mit dem Antikörper-Format. Als Konjugat wurde Ceftazidim-HRP von Squarix eingesetzt. ....	69
Abbildung 24: Einfluss der Konzentration des Beschichtungsantikörpers auf die Standardkurven (2,0 - 0,75 µg/mL). Als Konjugat wurde Ceftazidim HRP in einer Verdünnung von 1:50000 (20 ng/mL) in Stabilzyyme HRP 1:2 H <sub>2</sub> O eingesetzt. ....	70
Abbildung 25: Einfluss der Konjugatkonzentration auf den Verlauf der Standardkurve auf einer Platte mit 2 µg/mL CL40. Getestet wurden Verdünnungen 1:50.000 (20ng/mL), 1:75.000 (13,3 ng/mL), 1:125.000 (8 ng/mL) und 1:200.000 (5 ng/mL).....	71
Abbildung 26: Stabilität des Ceftazidim HRP Konjugats nach drei Tagen bei einer Lagerung bei 4°C und 40°C in verschiedenen Puffern.....	74
Abbildung 27: Stabilität der Standards in verschiedenen Puffern. Gezeigt wird die prozentuale Wiederfindung an Tag 1 und Tag 7 bei 4, 40 °C und bei -20 °C.....	77
Abbildung 28: Standardstabilität anhand der Kontrollen nach Lyophilisation. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Lagerung nach 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen.....	78
Abbildung 29: relative OD-Abnahme in % in Abhängigkeit der Konzentration des Standards. Gezeigt sind Ergebnisse des 7 Tage bei 40 °C gelagerten Lyophilisats. ....	78
Abbildung 30: schematische Darstellung des Testformats mit Antikörper Konjugat.....	79
Abbildung 31: Einfluss der BSA-Ceftazidim-Konzentration auf die Standardkurven. Als Konjugat wurde CL40- anti-Ceftazidim-HRP in einer Verdünnung von 1:30.000 (3,95 ng/mL) in Stabilzyyme HRP 1:2 H <sub>2</sub> O eingesetzt. ....	80
Abbildung 32: Titration des Konjugats CL40 HRP. MTPL ist mit 1 µg/mL BSA beschichtet. ....	81
Abbildung 33: Einfluss der Konzentration des Beschichtungsantikörpers auf die Standardkurve. Als Konjugat wurde Linezolid-HRP in einer Verdünnung von 1:170.000 (5,8 ng/mL) in Stabilzyyme HRP 1:2 H <sub>2</sub> O eingesetzt.....	82
Abbildung 34: Konjugattitration Linezolid-HRP auf einer MTPL mit 1 µg/mL Linezolid Antikörper CL18 beschichtet.....	83
Abbildung 35: Kurvenverlauf der Standardkurve von Linezolid in Abhängigkeit von der Beschichtungskonzentration mit BSA-Linezolid. Als Konjugat wurde CL18-HRP (20 ng/mL) verwendet.....	84
Abbildung 36: Kurvenverlauf in Abhängigkeit des pH- Werts des Beschichtungspuffers. Gezeigt ist die Beschichtung mit 1µg/mL in Puffern mit pH-Werten von 5,5 – 9,6. Als Konjugat wurde CL18 HRP (20ng/mL) verwendet.....	85
Abbildung 37: Konjugattitration auf der mit 1 µg/mL Linezolid-BSA beschichteten Platte. Titriert wurde von 1000 ng/mL- 5 ng/mL.....	86
Abbildung 38: Standardkurve des Ceftazidim Assays auf dem Vollautomaten DRG:HYBRID-XL mit den Kurvenspezifikationen. ....	91

Abbildung 39: Einfluss des Proben- und Konjugatvolumens auf die Kurvenform. Das Konjugat wurde in einer Verdünnung von 1:25.000 (4,7ng/mL) eingesetzt. ....	92
Abbildung 40: schematische Darstellung der Testabarbeitung des Ceftazidim ELISAs auf dem Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL.....	94
Abbildung 41: Temperatureinfluss auf die Standardkurve bei manueller Abarbeitung des ELISAs bei 37°C. Konjugatkonzentration 20 ng/mL in Stabilzyme HRP 1:2 H <sub>2</sub> O. links: Abarbeitung bei RT und 37°C mit Standardreihe bis 300 ng/mL. Rechts: Angleichung der Standardkurvenverhältnisse durch 10-fache Verstärkung des Standards. Datenpunkte jeweils rechts der Diagrammpunkte dargestellt. ....	95
Abbildung 42: Konjugattitration von 50 ng/mL- 25 ng/mL in Stabilzyme HRP 1:2 H <sub>2</sub> O. Gezeigt ist die OD bei 645 nm/450 nm (Linie, Primärachse) und die relative OD in Prozent (Balken, Sekundärachse). ..	96
Abbildung 43: Einfluss der Inkubationszeit auf den Kurvenverlauf. Standardkurve von 0-3500 ng/mL in Phosphatpuffer pH 5,5. Konjugat 25 ng/mL in Stabilzyme HRP 1:2 H <sub>2</sub> O. Gezeigt ist der Kurvenlauf (Primärachse, Linie) und die relativ OD in Prozent (Sekundärachse, Balken). ....	97
Abbildung 44: Einfluss des Probenvolumens auf die Wiederfindung der Proben im Vergleich zum Zielwert. Gezeigt sind relative ODs in % (Primärachse, Linie) und der Mittelwert (MW) der Wiederfindung zum Zielwert von sechs Proben aus dem EUREKA- Kit LC-79016. Das Konjugat wurde in einer Konzentration von 25 ng/mL in Stabilzyme HRP 1:2 H <sub>2</sub> O verwendet.....	98
Abbildung 45: Testabarbeitung des Linezolid ELISAs auf dem Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL.....	99
Abbildung 46: grafische Darstellung der Homogenität der im Prototyp 1 Ceftazidim verwendeten Platten der Charge 457ACW031. ....	100
Abbildung 47: grafische Darstellung der Homogenität der im Prototyp 1 Linezolid verwendeten Platten der Charge 459ACW071. ....	101
Abbildung 48: Mastercurve für Ceftazidim 457K031-1 und Linezolid 459K071-1. Fehlerindikatoren für Standardabweichungen in Rot. ....	102
Abbildung 49: Bland Altman Plot relative Differenz der Messungen vom Zielwert in % in Abhängigkeit von der Konzentration an Ceftazidim (ng/mL) in der Probe. Zusätzlich ist das Konfidenzintervall durch die beiden hellgrauen Linien.....	114
Abbildung 50: Bland Altman Plot der Ergebnisse der Ermittlung der Richtigkeit der Messung des Linezolid Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL. Gezeigt ist die relative Differenz der Messung in % in Abhängigkeit der Konzentration an Linezolid bis 1200 ng/mL in der Probe. Zusätzlich ist das Konfidenzintervall mit * und – 1,96SD angegeben.....	116
Abbildung 51: Passing-Bablok der linearen Verdünnung. Gezeigt ist das Verhältnis der erwarteten zu der gemessenen Ceftazidim Konzentration. Zusätzlich ist eine lineare Trendlinie erstellt worden, die die Steigung $y=3,417+1,021x$ hat.....	120
Abbildung 52: grafische Darstellung der Korrelation der vergleichenden Messung von 27 Proben auf dem DRG.HYBRID-XL und der LC-MS LMU, München. Eine Trendlinie mit angegebener Steigung gibt das Maß der Korrelation an. ....	138
Abbildung 53: Bland-Altman-Plot der Ergebnisse des Methodenvergleichs für Ceftazidim. ....	138
Abbildung 54: Passing-Bablok Korrelation der vergleichenden Messung von 40 Proben auf dem DRG.HYBRID-XL und der LC-MS an der LMU in München. Eine Trendlinie mit angegebener Steigung gibt das Maß der Korrelation an. ....	141



Abbildung 55: Bland-Altman- Plot Methodenvergleichs für Linezolid. .... 142

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
A- Stelle	Aminoacyl-Stelle
ABS	Antibiotic-Stewardship
AcrB	acriflavine resistance B
ACW	Antibody coated Well
AK	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
bspw.	beispielsweise
BVL	Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
C1 /C2	Kontrolle 1 / Kontrolle 2
CAS	Chemical Abstract service registry number
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic acid)
E.Coli	Escherichia coli
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assays
E-Stelle	Exit-Stelle
ETDA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fc-Fragment	Cristallisierendes Fragment (engl. fragment crystallisable)
FDA	Food and Drug Administration
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunden
H <sub>2</sub> O (dest.)	Wasser (destilliertes Wasser)
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch: horseradish peroxidase)
IFU	Instruction for Use (Gebrauchsanweisung)
Ig	Immunglobulin
ISO	International Organization for Standardization
IVD	In-vitro-Diagnostika
kb	Kilobasen
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
Konz.	Konzentration
LC-MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie
LoB	Limit of Blank

LoD	Limit of Detection
LoQ	Limit of Quantification
M	molar
MC	Mastercurve
mg	Milligramm
min	Minuten
min.	minimal
mL	Milliliter
mM	millimolar
Mm	Millimeter
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
ng	nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PABA	Para-Aminobenzoesäure
PBPs	Penizillin bindende Proteine
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	Potentia hydrogenii
P-Stelle	Polypeptid- Stelle
QC1/ QC2 /QC3	Qualitätskontrolle
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
RTU	Gebrauchsfertig (engl. ready-to-use)
S0- S5	Standard 0 bis 5
SD	Standardabweichung
S <sub>max</sub>	Maximaler Standard
t	Zeit
TDM	Therapeutisches Drug (Medikamente) Monitoring
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tRNA	Transport-RNA (engl. transfer RNA)
TW 1/2/3	Testwell
TWP	Waschpuffer mit Tween
USA	United States of America
VK	Variationskoeffizient
WHO	World Health Organization

z. B	zum Beispiel
z.B.	zum Beispiel
ZKÜ	Zellkulturüberstände

# 1 Zusammenfassung

Schwere Sepsis und septischer Schock gehören mit einem Anteil von 20–80 % der Erkrankungen und einer Sterblichkeitsrate von 22–76 % bei Intensivpatienten zu den dringendsten Problemen der modernen Medizin. Das Verbundprojekt „DiabKON“ (Diagnostische Antibiotika-Therapie-Kontrolle), aus dem diese Dissertation hervorgegangen ist, versucht die Behandlung von Intensivpatienten durch eine kontrollierte Antibiotikatherapie zu verbessern. Im Mittelpunkt steht dabei das Therapiemonitoring, bei dem eine erneuten Antibiotikagabe in Abhängigkeit von der zeitnahen Bestimmung der Antibiotikakonzentration im Blut des Patienten erfolgen sollte. Das Projekt wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung in der Fördermaßnahme „KMU-innovativ: Medizintechnik“ (FKZ 13GW0354 A-F) gefördert. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Immunoassays, welche die schnelle, kostengünstige und quantitative Bestimmung der Antibiotika Linezolid und Ceftazidim aus humanen Blutproben erlauben. Die Ergebnisse der zwei Immunoassays sollten mit der Referenzmethode LC-MS/MS vergleichbar sein.

Dazu wurden in einem ersten Schritt zunächst monoklonale Antikörper generiert, indem Mäuse mit den an Trägerproteinen gebundene Antibiotika immunisiert wurden. Milzzellen von Mäusen mit dem höchsten Antikörpertiter wurden danach mit Myelomzellen zu Hybridomzellen fusioniert. Die Selektion der besten positiven Klone erfolgte anschließend über einen direkten kompetitiven ELISA über mehrere Screening-Runden. Die Entwicklung der Assays für Linezolid und Ceftazidim beinhaltete die Optimierung der Testprozedur mit der Prüfung mehrerer Testformate sowie die Etablierung einer Standardkurve für einen quantitativen Nachweis. Eine Optimierung der verwendeten Reagenzien konnte zudem die Stabilität des Assays und damit die Zuverlässigkeit der Messung maßgeblich verbessern. Nach der Entwicklung konnten im Zuge der Verifizierung und Validierung der beiden Tests alle erforderlichen Leistungsparameter der Assays ermittelt werden. Es zeigte sich, dass beide Tests alle regulatorischen Anforderungen bezüglich Genauigkeit, analytischer Sensitivität, Stabilität und Reproduzierbarkeit erfüllten. Die Methodenvergleiche zeigten eine sehr gute Vergleichbarkeit zur Referenz-Methode LC-MS/MS. Beide Tests können auf dem Instrument DRG:HYBRID-XL der Firma DRG Instruments GmbH vollautomatisch durchgeführt werden. Sie dienen der schnellen quantitativen Erfassung der Antibiotikakonzentration von Linezolid und Ceftazidim im Blut und ermöglichen somit eine enge und zeitnahe Kontrolle der Antibiotika-Therapie.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, weitere Tests gegen häufig verwendete Antibiotika zu entwickeln, die dann zum Therapiemonitoring der Antibiotikabehandlung verwendet werden können

## 2 Summary

Severe sepsis and septic shock are among the most urgent problems of modern medicine, accounting for 20-80% of illnesses and a mortality rate of 22-76% in ICU patients. The joint project "DiabKON" (Diagnostic Antibiotic Therapy Control), from which this dissertation emerged, attempts to improve the treatment of intensive care patients through controlled antibiotic therapy. The focus is on therapy monitoring, in which a renewed administration of antibiotics should depend on the timely determination of the antibiotic concentration in the patient's blood. The project was funded by the German Federal Ministry of Education and Research under the funding measure "KMU-innovativ: Medizintechnik" (FKZ 13GW0354 A-F). The aim of this work was to establish immunoassays that allow the rapid, cost-effective and quantitative determination of the antibiotics linezolid and ceftazidime from human blood samples. The results of the two immunoassays should be comparable with the reference method LC-MS/MS.

To this end, monoclonal antibodies were first generated by immunizing mice with the antibiotics bound to carrier proteins. Spleen cells from mice with the highest antibody titer were then fused with myeloma cells to form hybridoma cells. Selection of the best positive clones was then performed by direct competitive ELISA over multiple rounds of screening. Assay development for linezolid and ceftazidime included optimization of the assay procedure with testing of multiple assay formats and establishment of a standard curve for quantitative detection. Optimization of the reagents used also significantly improved the stability of the assay and thus the reliability of the measurement. Following development, verification and validation of the two tests enabled all the required performance parameters of the assays to be determined. It was found that both assays met all regulatory requirements in terms of accuracy, analytical sensitivity, stability and reproducibility. The method comparisons showed very good comparability to the reference method LC-MS/MS. Both tests can be performed fully automatically on the DRG:HYBRiD-XL instrument from DRG Instruments GmbH. They are used for rapid quantitative detection of antibiotic concentrations of linezolid and ceftazidime in the blood and thus allow close and timely control of antibiotic therapy. The findings of this work contribute to the development of further tests against commonly used antibiotics, which can then be used for therapy monitoring of antibiotic treatment.

### 3 Einleitung

Als Alexander Flemming 1928 durch einen Zufall das Penicillin entdeckte, revolutionierte er die moderne Medizin. Wo zuvor auf Heilkräuter zurückgegriffen wurde, konnte jetzt mit einem Antibiotikum geholfen werden, um bakterielle Infektionen zu bekämpfen.

Auch heute noch liegen die Todesraten für eine Sepsis mit 22-76 % in den hochentwickelten Industrieländern der USA und Europas hoch (Fleischmann-Struzek et al., 2022; Levy et al., 2012). Damit gilt die Behandlung von schweren bakteriellen Entzündungen bis hin zu einem septischen Schock als eines der wichtigsten medizinischen Probleme auf den deutschen Intensivstationen (Bauer et al., 2020; Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, 2016; Singer et al., 2016). Jährlich werden über 2 Millionen Patienten intensivmedizinisch versorgt, dabei stellt eine schwere Infektion die häufigste Todesursache dar (Rudd et al., 2018). Um die Mortalität von Sepsis Patienten zu senken, ist eine individuelle Optimierung der Antibiotikatherapie sowohl aus ethischen als auch ökonomischen Gesichtspunkten besonders wichtig (Fleischmann et al., 2016; Fleischmann-Struzek et al., 2020; Richter et al., 2017).

#### 3.1 Antibiotika

Antibiotika sind Substanzen, die das Wachstum von Bakterien einschränken. Der Begriff leitet sich aus dem lateinischen „Antibiose“ ab, welcher die Benachteiligung eines Organismus in Wachstum und Fortpflanzung bei gleichzeitiger Anwesenheit beschreibt (Spektrum Verlag, 2020).

Schon Louis Pasteur beobachtete 1877, dass sich manche Bakterien gegenseitig am Wachstum hindern (Pasteur, 1877).

Noch bevor Alexander Flemming die Hemmhöfe auf seinen, im Labor vergessenen, Kulturschalen bemerkte, gab es schon einen jungen Forscher in Frankreich, der 1893 auch diese Entdeckung machte. Ernest Duchesne, ein französischer Militärarzt, zeigte schon 30 Jahre vor Flemming die antibiotische Wirkung von Schimmelpilzen (Duckett, 1999). Er führte zahlreiche Experimente im Rahmen seiner Doktorarbeit zur Wechselwirkung von *E.Coli* Bakterien und dem entdeckten Schimmelpilz *Penicillium glaucum* durch. Auch auf das Typhusbakterium hatte der Schimmelpilz einen Einfluss. So erkrankten Tiere, die eine tödliche Dosis des Typhus- Erregers injiziert bekamen, nicht, wenn sie gleichzeitig mit *Penicillin Glaucum* beimpft wurden (Tonner & Hein, 2019). Der später von Flemming entdeckte Stamm *Penicillium Notatum* zeigte diese Wirkung nicht (Fleming, 1929).

Da Duchesnes Doktorarbeit nicht anerkannt wurde, wurden die Ergebnisse des damals 23-Jährigen nicht international veröffentlicht.

Im Jahr 1910 wurde von Paul Ehrlich das Arsphenamin für die Behandlung von Syphilis eingeführt. Das Gemisch aus Arsenverbindungen wurde als das erste Schmalspektrum-Antibiotikum beschrieben (Hüntelmann, 2006).

Nach der „offiziellen“ (Wieder-) Entdeckung des Penicillins durch den Briten Alexander Fleming im Jahr 1928 dauerte es noch einige Jahre, um das Penicillin einsatzfähig zu machen. Um das Medikament an Patienten einsetzen zu können, bedurfte es mehrere Jahre der Forschung, da es nicht möglich war, das Penicillin chemisch zu synthetisieren (Bush & Bradford, 2021). So kam es am 12.02.1941 zum ersten Mal in der Behandlung zum Einsatz. Der Polizist Albert Alexander verletzte sich an einem Rosendorn. Der zunächst kleine Kratzer infizierte sich und bildete Abszesse. Nach der Behandlung mit dem Penicillin in Oxford sank sein Fieber innerhalb von 24 Stunden (h) und sein Allgemeinzustand verbesserte sich. Howard Florey, der behandelnde Arzt, konnte seine Behandlung allerdings nicht erfolgreich abschließen. Der Heidelberger Medizinhistoriker Wolfgang Eckhardt sagt in einem Interview mit dem Deutschlandfunk, dass er denke, dass ihm sowohl zu wenig als auch zu unreines Penicillin zur Verfügung stand. Der Patient verstarb am 15.03. 1941, nachdem seine Symptome wieder auftraten (Winkelheide, 2021). Antibiotika zählen zu den am meisten verschriebenen Medikamenten weltweit (Schweickert et al., 2013). Es kommt jedoch zu einer Begünstigung von Resistenzen durch unsachgemäße Verschreibung z.B. bei Atemwegsinfektionen, die durch einen viralen Ursprung keine Behandlungsindikation haben. Die ambulanten Verschreibungen machen etwa 85 % der insgesamt verordneten Antibiotika aus (BVL, 2012; Huttner et al., 2015).

## 3.2 Klassifizierung der Antibiotika

Zunächst unterscheidet man generell zwei Wirkungsarten von Antibiotika. Wirkt das Medikament bakteriostatisch, so wird die Vermehrung der Bakterien eingeschränkt, die Bakterien werden allerdings nicht abgetötet. In die Wirkungsweise bakterizid, so werden die Bakterien abgetötet. Dies erfolgt z.B. durch die Auflösung der Zellwand (Brinkmeier & Frosch, 2002).

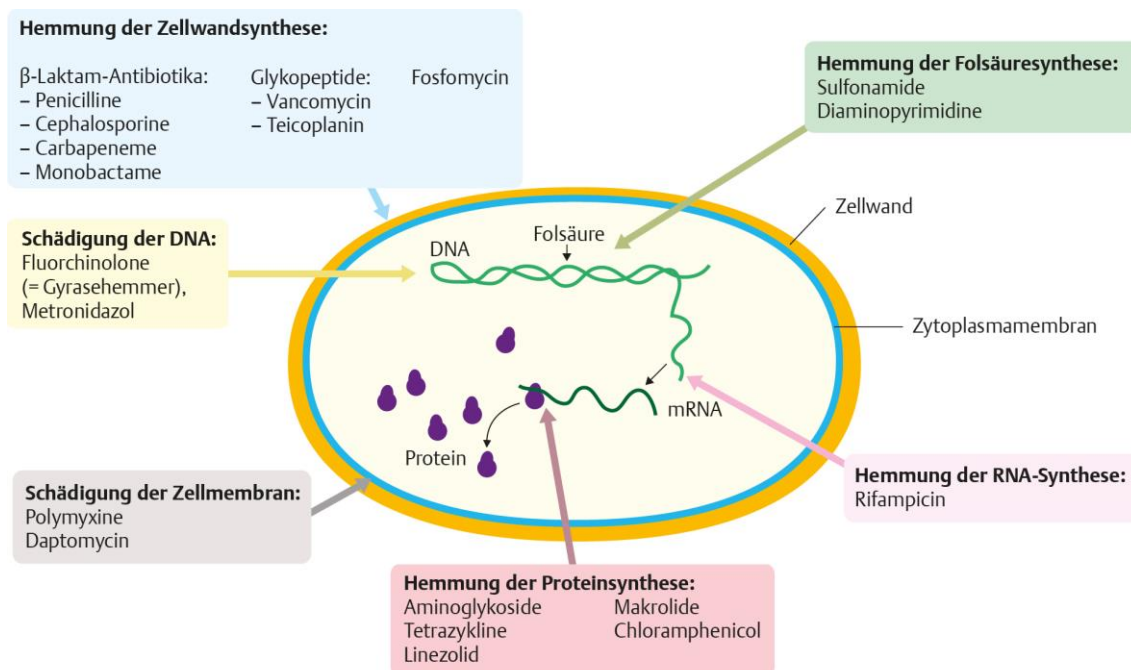
Zusätzlich gibt es Antibiotika, die eine weites Wirkungsfeld haben, somit gegen viele verschiedene Erreger eingesetzt werden können, und daher als Breitbandantibiotika bezeichnet werden.

### 3.2.1 Klassifizierung der Antibiotika nach Wirkmechanismus

Die Klassifizierung der Antibiotika kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Besonders anschaulich ist die Aufteilung nach Angriffspunkten der Antibiotika.

Jede der Gruppen greift an verschiedene Punkte an der Bakterienzelle an, die alle essenziell für die Proliferation dieser sind.





Georg Thieme Verlag, Stuttgart · New York  
 | care Pflege · 2020

Abbildung 1: Bakterienzelle (schematisch) mit Angabe der Angriffspunkte und Mechanismen verschiedener Antibiotika. (<https://www.thieme.de/de/pflegepaedagogik/6-infektiologie-151808.htm>)

Die beta- Lactam Antibiotika hemmen das Bakterienwachstum, in dem sie in die Synthese der Peptidoglykanschicht eingreifen. Diese Arzneimittel hemmen die Transpeptidase-, Transglykosylase- und/oder Carboxypeptidase-Aktivität artspezifischer, membrangebundener Penicillin-bindender Proteine (PBPs) und verhindern so die Quervernetzung von Zellwandkomponenten im letzten Schritt der bakteriellen Zellwandsynthese (Lima et al., 2020). Andere Antibiotika greifen direkt in die DNA-Synthese der Bakterien ein. Dabei wenden sie verschiedene Techniken an. Zunächst müssen alle Antibiotika, die in die RNA-Transkription oder die DNA-Replikation eingreifen möchten, durch die Zellwand der Bakterien diffundieren, um ihren Wirkungsort zu erreichen (Oakley, 2019).

Die Fluorchinolone z.B. hemmen die DNA- Synthese, indem sie die Windung der Stränge durch die TypII- Topoisomerase (DNA-Gyrase und Topoisomerase IV) unterbinden. Da die DNA in diesem Zustand für die Polymerasen unbrauchbar wird, kann keine DNA-Synthese mehr stattfinden (Luan & Drlica, 2018). Es werden aber ausschließlich die bakteriellen Enzyme beeinflusst.

Eine andere Gruppe, die Anthracycline, die auch in der Krebstherapie verwendet werden, wirkt sowohl auf die bakterielle also auch die DNA- Replikation von humanen Zellen. Die interagieren durch Bildung von kovalenten Bindungen oder Basenmodifikationen, die zu einem apoptotischen Zelltod. Da im Fall eines Tumors die malignen Zellen ein schnelleres Wachstum aufweisen, werden diese mehr geschädigt als das umgebene Gewebe (Siegel et al., 2012).

Die Proteinsynthese- beeinflussenden Antibiotika haben die Ribosomen der Bakterienzellen zum Ziel. Sie sind zielgenau und wirken nur in den prokaryotischen Zellen. In Prokaryotischen Zellen

werden die Ribosomen aus zwei Untereinheiten, die kleinere 30 s und die größere 50 s, zusammengesetzt. Dieses bindet die mRNA, um das Ablesen von Nukleotidsequenzen zu ermöglichen. Während der drei aufeinanderfolgenden Phasen Initiations-, Elongations- und Terminationsphase binden die tRNAs an die A (Aminoacyl)-, P (Polypeptid)- und E- (Exit) Stellen des Ribosoms (Abbildung 2).

Oxazolidinone binden an die P-Stelle der ribosomalen 50S-Untereinheit.

Sie hindern die Bindung der tRNA und die Bildung des Initiationskomplexes. So verhindert die Bindung von Oxazolidinonen den Transfer der Peptidkette von der A- Stelle zur P- Stelle während der Peptidbindungsbildung (Vara Prasad, 2007).

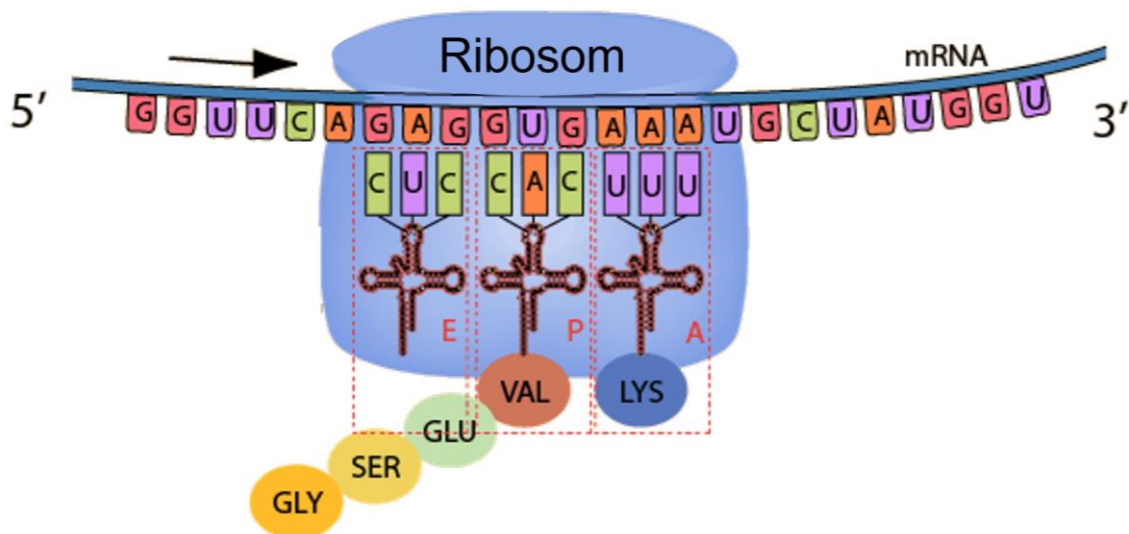


Abbildung 2: schematische Darstellung der prokaryotischen Proteinbiosynthese. Verändert nach:

<https://i.stack.imgur.com/YJL3J.gif>

Um es gar nicht erst zur Proteinbiosynthese kommen zu lassen, greifen spezielle Antibiotika spezifisch in die Synthese von Folsäure in den Prokaryonten ein. Sie hemmen als Struktur analogon von 4-Aminobenzoessäure (PABA) kompetitiv die Synthese.

Neben der Einteilung der Antibiotika nach ihrer Funktion können sie auch nach ihrer chemischen Struktur unterteilt werden.

Diese Einteilung ist sehr komplex. Die ältesten und größten strukturähnlichen Gruppen der Antibiotika sind die beta-Lactam Antibiotika, die auch heute meist Breitbandantibiotika verwendet werden. Diese haben alle eine gemeinsame Grundstruktur, den Beta-Laktam-Ring.

Beta-Lactam Antibiotika werden in die strukturähnlichen Untergruppen der Penizilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame unterteilt.

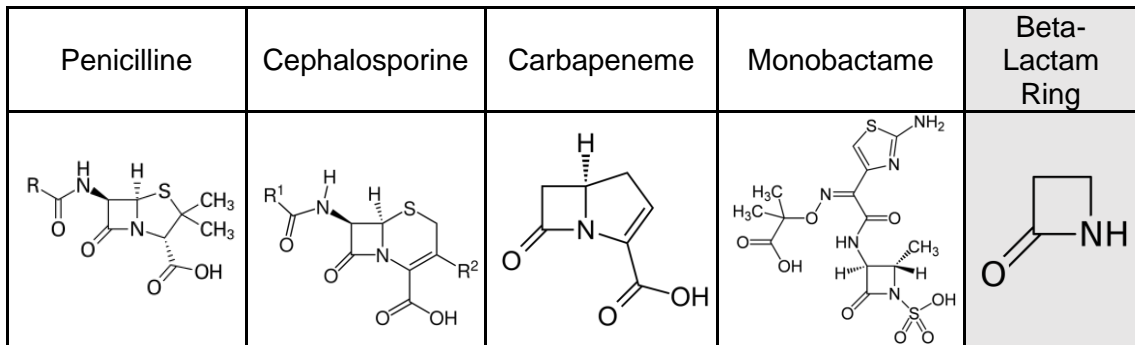


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der Untergruppen der beta- Lactam Antibiotika. Zusätzlich ist der beta- Lactam- Ring gesondert dargestellt.

Alle weiteren nach chemischer Struktur geordneten Antibiotika sind nur auf eine Gruppe begrenzt. Diese lassen sich nicht zusammenfassen, da sie sich untereinander zu deutlich unterscheiden. Linezolid gehört der Gruppe der Oxazolidinone an, die sich durch einen Fünfring, der sowohl ein Stickstoff als auch ein Sauerstoff-Atom und eine Carbonyl Gruppe trägt.

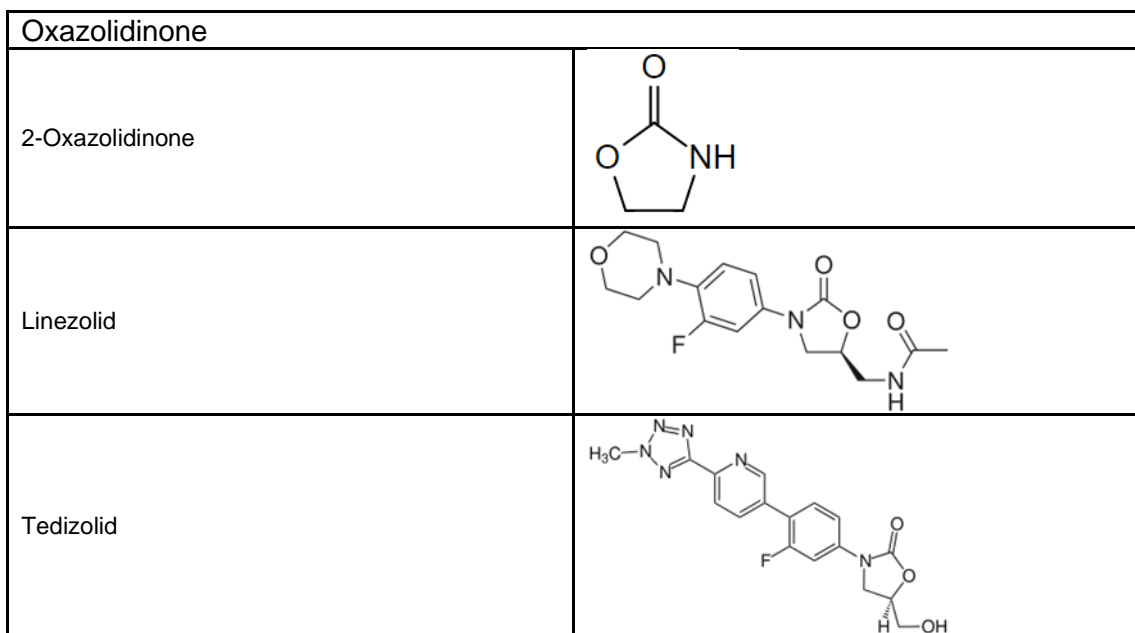


Abbildung 4: Vergleichende Darstellung der Antibiotika in der Gruppe der Oxazolidinone. Zusätzlich ist die strukturelle Gemeinsamkeit das 2-Oxazolidinon dargestellt.

### 3.2.2 Ceftazidim

Ceftazidim gehört zu den Cephalosporinen und wird hauptsächlich für die Behandlung von gramnegativen Bakterien verwendet (O'callaghan, 1979a).

Durch die Hemmung der Zellwandsynthese wird das Bakterienwachstum eingedämmt, und die Bakterien sterben ab. Das Breitbandantibiotikum wirkt somit bakterizid (Gerabeck, 2011). Die Gabe des Medikaments kann sowohl intravenös, intramuskulär als auch als Infusion gegeben werden (Roberts et al., 2016). Eine orale Gabe kommt nicht in Frage, da es nicht resorbiert werden kann. Meist wird es im Zusammenhang mit Atemwegs-, Harn,- oder Weichgewebeeinfektionen eingesetzt (Hites et al., 2013).

Die Halbwertszeit nach Injektion beträgt etwa 2 h. Die Proteinbindung an Albumin im Serum beträgt nur 10%. Größtenteils erfolgt die Ausscheidung über die glomeruläre Filtration der Nieren (O'callaghan, 1979b).

### 3.2.3 Linezolid

Linezolid gehört zu der Gruppe der Oxazolidinone und ist ein relativ junges Antibiotikum. Die Zulassung erfolgte erst 2000 durch die FDA (Hashemian et al., 2018).

Durch die Hemmung der Proteinbiosynthese an den 50S- Untereinheiten des Ribosoms wirkt es gegen grampositive Bakterien (Simon et al., 2020)

Linezolid ist eine Reserveantibiotikum und das einzig gegen *Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA)* wirksame intravenös verabreichbare Medikament (Ager & Gould, 2012; Wunderink et al., 2012). Es ist neben Vancomycin im klinischen Gebrauch sehr wichtig (Zoller et al., 2014).

Die Bioverfügbarkeit von Linezolid ist sehr hoch, nur weniger als 3 % werden an Proteine im Serum gebunden (MacGowan, 2003). Der maximale Plasmaspiegel sollte nach 1-2 h erreicht werden, bei intravenöser Verabreichung des Medikamentes sogar schon nach 30 Minuten (min). Die Halbwertszeit beträgt 5 h (French, 2003; Hashemian et al., 2018)

### 3.3 Antibiotika Resistenzen

Generell ist zwischen Toleranz und Resistenz zu unterscheiden. Als Resistenz bezeichnet man im Allgemeinen einen Widerstand gegen äußere Einflüsse (Spektrum Verlag, 2020). Natürliche Resistenzen beruhen oft darauf, dass Organismen keine empfindlichen Strukturen besitzen oder zelluläre Barrieren den Wirkort von Antibiotika nicht erreichen können. Erworbene Resistenzen hingegen können sich einzelne Bakterienstämme zum Beispiel durch die Aufnahme von Plasmiden mit Resistenz-Genen aneignen. Es ist auch möglich, dass durch eine Mutation eines entsprechenden Gens eine Resistenz entsteht.

Die Resistenz von Bakterien gegen Antibiotika ist ein natürliches Phänomen. In der Natur bilden Bakterien und Pilze fortlaufend antibakterielle Stoffe, gegen die sie selbst immun sind. Es ist zu beobachten, dass dieser Prozess der Resistenzbildung mit Einführung der ersten Antibiotika ab 1941 deutlich beschleunigt wurde (Montiel-Riquelme et al., 2020). Gerade der starke Gebrauch in der Tier- und Humanmedizin fördert die Resistenzbildung (Kern, 2015). So zeigte die MRSA-Rate bei Geflügel eine Zunahme um 15 %, bei Heimtieren waren es im Jahr 2012 sogar 35 %. Im Jahr 2012 wurden 1,619 t Antibiotika an Tiermediziner abgegeben, davon machten den größten Teil Tetracycline mit 566t und Penicilline mit 498 t aus (BVL, 2012).

Bakterien haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um resistent gegen Antibiotika zu werden.

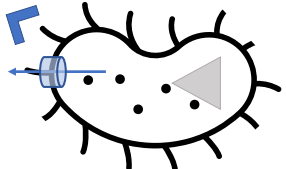
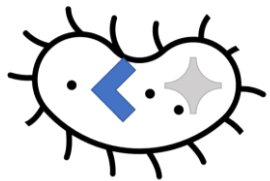
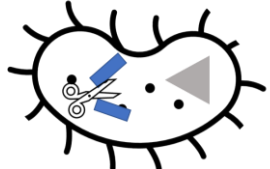
Zum einen nutzen sie hocheffiziente Pumpensysteme wie die AcrB- Pumpen (Pos, 2009). Auch eine chemische Modifikation des Zielmoleküls verhindert die Bindung des Antibiotikums in oder an der Bakterienzelle. Durch die Methylierung von RNA-Untereinheiten werden die Angriffspunkte beispielsweise von Oxazolidinone unzugänglich gemacht (Felden & Cattoira, 2018).

Viele grampositive und gramnegative Bakterien können Enzyme bilden, mit denen sie den Lactam-Ring der Beta-Lactam Antibiotika hydrolysieren und so aufspalten (Bush, 1988; Sykes & Matthew, 1976). Ohne diese Grundstruktur, den Beta-Lactam Ring, ist das Antibiotikum unbrauchbar.

Antibiotika Resistenzen werden auf verschiedene Weise durch unser gesellschaftliches Verhalten gefördert. In Krankenhäusern und auch im privaten Umfeld werden der Patient: innen Antibiotika verabreicht. Im klinischen Umfeld kann die Dosierung schnell angepasst werden, allerdings entstehen auch hier durch Unterdosierung oder den Einsatz des falschen Antibiotikums Resistenzen (Friedrichs et al., 2020).

Antibiotika Resistenzen werden auf verschiedene Weise durch unser gesellschaftliches Verhalten gefördert. In Krankenhäusern und auch im privaten Umfeld werden der Patient: innen Antibiotika verabreicht. Im klinischen Umfeld kann die Dosierung schnell angepasst werden, allerdings entstehen auch hier durch Unterdosierung oder den Einsatz des falschen Antibiotikums Resistenzen (Friedrichs et al., 2020).

Tabelle 1: schematische Darstellung der Resistenzmechanismen von Bakterien gegen Antibiotika. Das Antibiotikum dargestellt in blau, wird auf verschiedene Weise daran gehindert seinen Angriffspunkt (grau) zu erreichen.

Resistenzmechanismus	Methode	
Export des Antibiotikums	Transportproteine z.B. Effluxpumpen	
Veränderung des Wirkungsort	Modifikation der Angriffsregion	
Inaktivierung des Antibiotikums	Enzymatische Spaltung oder Bindung des Antibiotikums z.B. Beta-Lactamase	

In der ambulanten Versorgung kommt es häufig vor, dass Patienten eine Antibiotikabehandlung nicht bis zu Ende durchführen (Schulz-Stübner, 2020). Sobald die Antibiotika anschlagen, und sich eine Besserung der Beschwerden einstellt, werden die Medikamente eigenmächtig abgesetzt. Jedes nicht abgetötete Bakterium ist potenziell resistent gegen einen weiteren Einsatz des Antibiotikums.

Durch Abflüsse gelangen Antibiotika auch in das Abwasser und können von Kläranlagen nicht vollständig herausgefiltert werden.

Ein weiterer großer Risikofaktor ist die Landwirtschaft. Um Tiere in engen Ställen halten zu können, ist eine Antibiotika-Prophylaxe meist von Vorteil, da eine Infektion sich bei der räumlichen Nähe schnell auf den gesamten Tierbestand ausbreiten würde. Besonders gefährdet sind hier Mastbetriebe für Geflügel und Schweine (Roth et al., 2019; Tenhagen et al., 2018).

Aber auch in pflanzlichen Lebensmitteln sind Antibiotika-Rückstände zu finden, da hier teilweise natürlicher Dünger, der hauptsächlich aus Urin und Kot der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung verwendet wird und Antibiotika-Rückstände enthält, ausgebracht wird. Auch das in den Gewächshäusern genutzte Wasser kann Rückstände von Antibiotika enthalten, die sich in den Pflanzen anreichern (Heuer et al., 2011; H. Zhang et al., 2016).

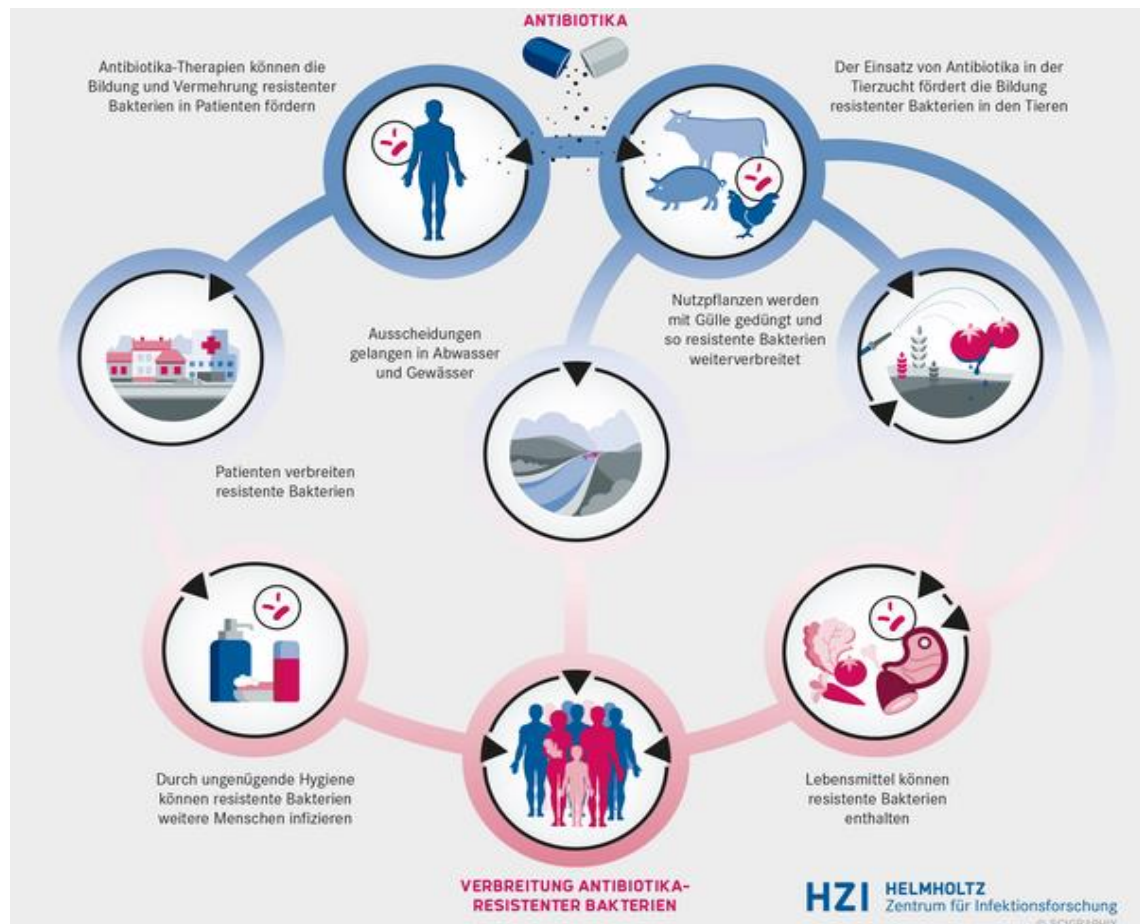


Abbildung 5: schematische Darstellung der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen in verschiedenen Bereichen des alltäglichen Lebens. Quelle: <https://www.helmholtz-hzi.de/de/aktuelles/thema/weltantibiotikawoche-2019/>

### 3.4 Therapeutisches Drug Monitoring

Als Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) bezeichnet man die Messung von Medikamentenkonzentration während einer Behandlung. Dies dient zur Dosisanpassung und trägt somit zu einer optimierten Behandlung des Patienten bei.

Bei der Überprüfung der Dosierung unterscheidet man in die Bestimmung des Tal- und Spitzenspiegels (Kang & Lee, 2009).

Um den Talspiegel zu bestimmen, wird am Ende des Dosierungsintervalls eine Blutprobe entnommen, um zu prüfen, wieviel Wirkstoff vor der erneuten Gabe des Medikaments noch im Patienten vorhanden ist (Ploy et al., 2020).

Hat ein Medikament besonders toxische Eigenschaften oder bei hoher Dosierung starke Nebenwirkungen, so wird der Spitzenspiegel bestimmt (Chow et al., 2005). Dies geschieht zum einen, um die Dosierung für die Patienten nicht zu hoch zu wählen, und zum anderen aber, um sicherzugehen, dass die Dosierung ausreichend ist.

Dafür ist es nötig, je nach Medikament, ein bis drei h nach der Medikamentengabe eine Blutabnahme zu veranlassen.

Wird eine Medikation neu etabliert, beispielsweise in der Behandlung von psychischen Krankheiten, wird durch engmaschige Kontrollen der Serumkonzentration das Konzentrationsgleichgewicht (steady-state) ermittelt, um eine gleichbleibende Dosierung zu garantieren (Brinkmann et al., 2018). Diese Dosisanpassung wird hauptsächlich zu Beginn der Therapie durchgeführt, um die für den Patienten richtige Dosis zu ermitteln.

Das TDM findet somit zu verschiedenen Zeitpunkten in der medikamentösen Therapie Anwendung. Zu Beginn der Behandlung bei der Dosisermittlung (Psychopharmaka), zur Wirksamkeitskontrolle der Therapie, aber auch in Akutsituationen, in denen bei lebensbedrohlichen Infektionen sehr hohe Dosen von Antibiotika verabreicht werden müssen und so Gefahr einer Überdosierung besteht (Nosseir et al., 2014).

Mit der Hilfe von Computerprogrammen kann anhand der gemessenen Werte eine Konzentration-Zeit Korrelation im Blut des Patienten simuliert und vorausgesagt werden (Fuchs et al., 2013).



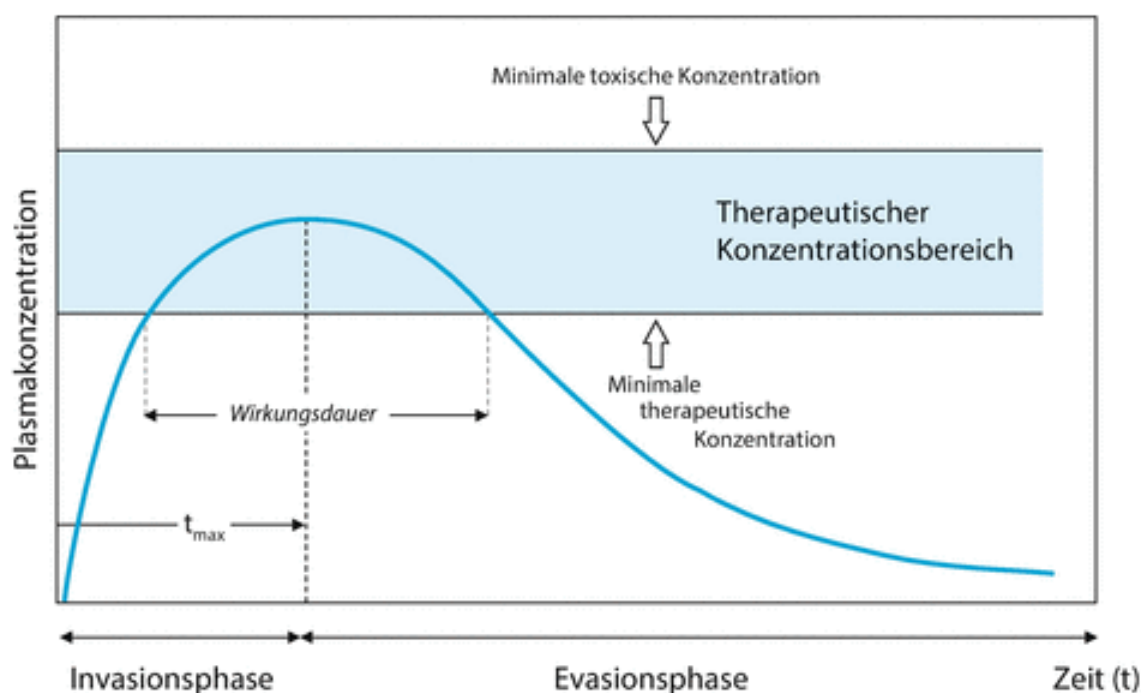


Abbildung 6: Plasmakonzentration in Abhängigkeit zur Zeit (t). Gezeigt ist die Wirkungsdauer des Antibiotikums im therapeutischen Konzentrationsbereich. Quelle:

[https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-45028-0\\_30-1](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-45028-0_30-1)

### 3.5 Antibiotic Stewardship (ABS)

In Anbetracht des Auftretens arzneimittelresistenter Erreger sollte eine patientenverträgliche Antibiotikatherapie auf allen Intensivstationen eingeführt werden (Chiotos et al., 2019; Pickens & Wunderink, 2019).

Das übergeordnete Ziel von Antibiotic Stewardship (ABS)-Programmen ist die Zusammenarbeit verschiedener Abteilungen eines Krankenhauses, um den Einsatz von Antibiotika zu optimieren, Infektionen wirksam zu behandeln und die Nebenwirkungen für Patienten zu minimieren (Dyar et al., 2017). ABS kann überall dort eingesetzt werden, wo Antibiotika verschrieben werden, also sowohl in der stationären Behandlung als auch in der ambulanten Medizin (Hermes et al., 2019; Rabold et al., 2022). Zunächst fand ABS in den Krankenhäusern Anwendung, weil dort meist resistente Erreger gefunden und viele Breitbandantibiotika verabreicht werden.

In der Humanmedizin werden in Deutschland laut dem Bericht der GERMAP 2012 700 bis 800 t Antibiotika jährlich verbraucht. Davon werden bis zu 90 % im ambulanten Bereich verschrieben (BVL, 2012).

Das System, nach dem das ABS funktioniert, beruht auf Aufmerksamkeit und Bewusstsein. Der Patient soll hier im Mittelpunkt stehen (Messacar et al., 2017). Die optimale Behandlung des Patienten beginnt mit der Wahl der richtigen Tests, um im Anschluss die richtige Medikation zu wählen (Wendt et al., 2020).

Ist die minimale Hemmkonzentration bestimmt, so kann auch das Therapeutische Fenster der Behandlung optimiert werden (Cunha, 2018).

Dann kommt es darauf an, den Patienten zu überwachen, und zu prüfen, ob die Medikamentendosis passend ist, oder ob eine Justierung vorgenommen werden sollte (Cusumano et al., 2020).

### 3.6 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist der körpereigene Schutzschild. Es ist ein Netzwerk, in welchem verschiedene Organe, Zelltypen und Moleküle zusammenwirken (Luttmann et al., 2014). Es kann in das angeborene und das adaptive, oder auch erworbene Immunsystem differenziert werden (Thomas, 2012)

Als angeborene Immunität bezeichnet man zelluläre Faktoren, wie Makrophagen, Granulozyten oder natürliche Killerzellen, molekulare Faktoren, wie das Komplementsystem, Zytokine oder Akute-Phase-Proteine, sowie natürliche Barrieren wie Haut und Schleimhäute. Als erste Barriere dient das angeborene Immunsystem bei Kontakt mit fremden Strukturen. Die Reaktion ist genetisch festgelegt, unspezifisch und nicht adaptiv und vermittelt die Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Die Aufgabe des adaptiven Immunsystems ist es, auf die primäre Immunantwort mit spezifischen Abwehrreaktionen zu reagieren. Dazu dienen T-Lymphozyten, ein Zelltyp, der nach Aktivierung der Differenzierung vielfältige Funktionen übernimmt, und B-Lymphozyten, die als humorale Immunabwehr die Antikörperproduktion regulieren. Das humorale Immunsystem ist der Teil des Immunsystems, der nicht auf Zellen einwirkt (zellvermittelte Immunantwort), sondern auf Plasmaproteinbasis agiert.

B-Lymphozyten haben spezifische B-Zell-Rezeptoren, die nach Antigenbindung die B-Lymphozyten-Differenzierung zu Plasmazellen einleiten. Plasmazellen sezernieren Antigen-spezifische Antikörper. Sie können Antigene binden, eine weitere Ausbreitung in vivo durch Neutralisation verhindern, sie für die Phagozytose durch Makrophagen markieren oder das Komplementsystem aktivieren. Aktivierte B-Lymphozyten fungieren nach dem Entfernen von Fremdstrukturen nach dem Erstkontakt als spezifische Gedächtniszellen, die genauer und schneller reagieren können, wenn Antigene erneut in Kontakt kommen (Raem & Rauch, 2007). Antikörper, allgemein auch als Immunoglobuline bezeichnet, sind vom Immunsystem gebildete Eiweißmoleküle zur Bekämpfung von beispielsweise Krankheitserregern. Ein Antikörper ist immer gegen ein spezifisches Antigen gerichtet (Padlan, 1994). Sobald der Organismus die Oberflächenstruktur des Antigens erkennt, werden Antikörper gegen diese produziert und anschließend freigesetzt (Sadava et al., 2019). Antikörper bestehen aus zwei identischen leichten Ketten (light-chain) und zwei identischen schweren Ketten (heavy chain), die über Disulfidbrücken verbunden sind. Jede Kette verfügt über eine konstante, sowie eine variable Region (Abbildung 7). Die variablen Regionen des Antikörpers erkennen das spezifische Epitop auf dem Antigen. Die Bindung des Antikörpers an das Epitop erfolgt immer mit dem Paratop am N-terminalen Ende des Antikörpers (Okda et al., 2016).

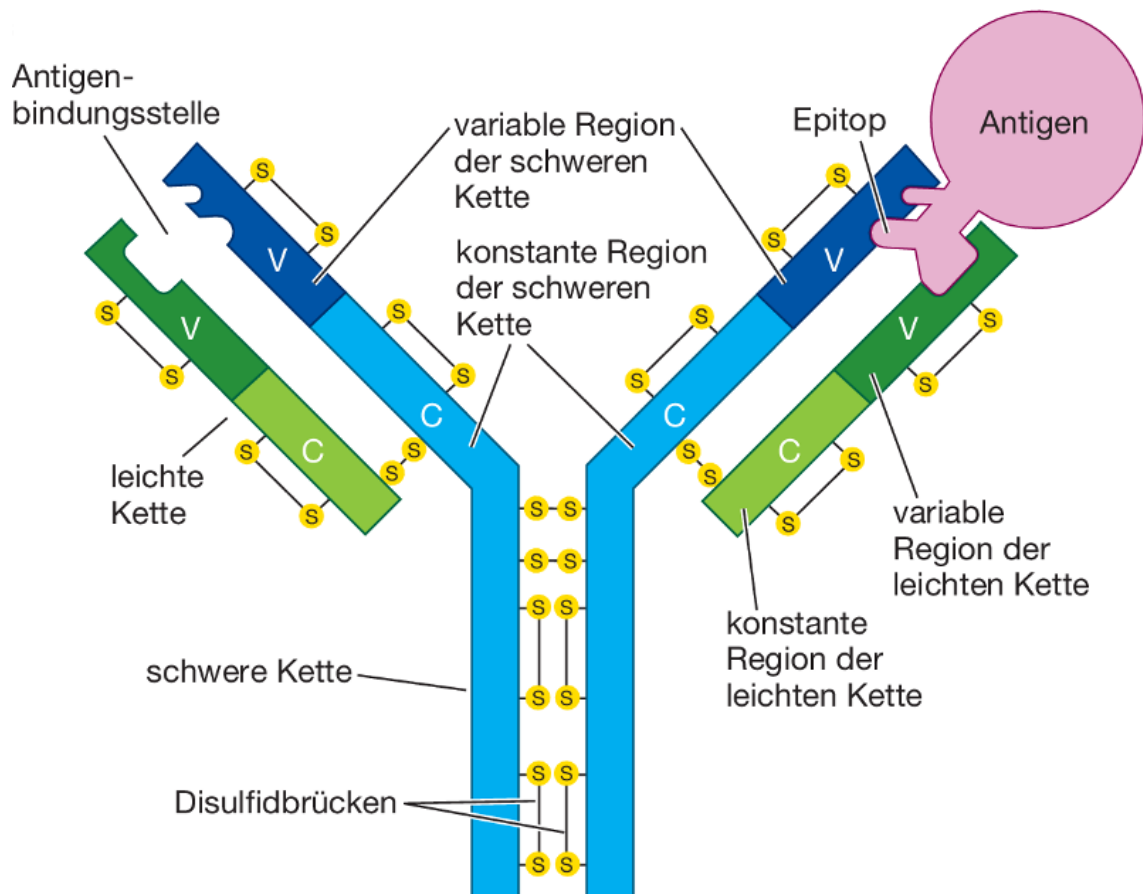


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Antikörpers. (Sadava et al., 2019)

Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen erfolgt zwischen Epitope und dem Epitop-spezifischen Paratop des Antikörpers. Die Bindung kann auf verschiedene Weise gefestigt werden. Zum einen durch Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Bindungen, hydrophobe Bindungen und van der Waals Kräften (Raem & Rauch, 2007).

Nach der Bindung des Antigens können Antikörper das Antigen neutralisieren oder für Makrophagen markieren, was zur Lyse des Antigens tragenden Pathogens führt.

Antikörper lassen sich in verschiedene Klassen gliedern, die unterschiedliche physiologische Funktionen erfüllen. Unterschieden werden die Immunglobuline A (IgA), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin E (IgE), Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) (Raem & Rauch, 2007; Sadava et al., 2019).

Die verschiedenen Klassen können als Monomer (IgD, IgE und IgG), als Dimer (IgA) und als Pentamer (IgM) vorkommen.

IgM-Antikörper werden direkt nach Erstinfektion mit einem Pathogen gebildet.

Die Klasse der IgG-Antikörper sind die spezifische Immunantwort und daher die quantitativ häufigste Gruppe der Immunglobuline im Blut. Drei Wochen nach Infektion erreicht die Bildung dieser IgGs ihren Höhepunkt und bildet danach das „immunologische Gedächtnis“ des Körpers.

IgE Antikörper sind nur wenig im Blut nachweisbar, sie werden im Fall einer allergischen Reaktion sehr schnell gebildet. Auch die IgD Antikörper sind mengenmäßig wenig im Blut zu finden, sie dienen hauptsächlich der Signalübertragung während der Immunabwehr (Padlan, 1994).

### 3.7 Hybridom-Technik

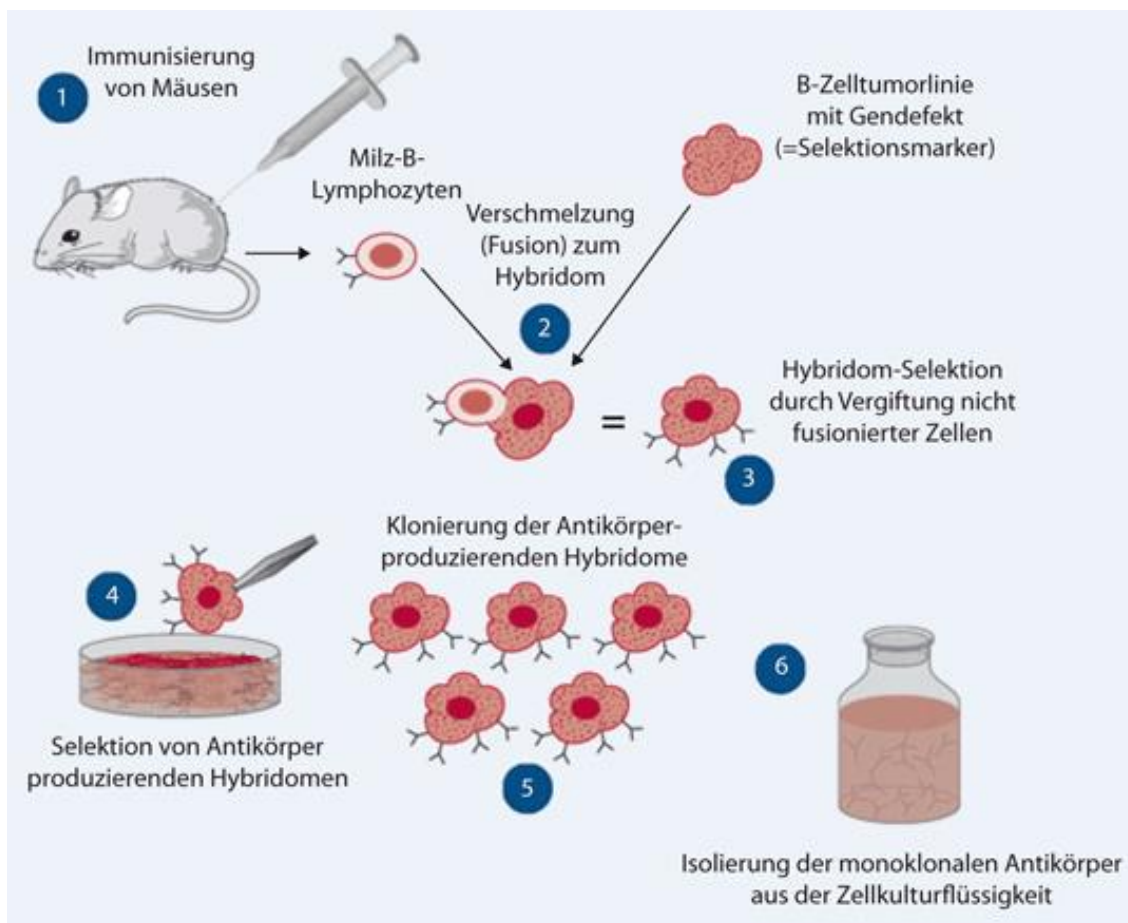
Die Hybridom Technik ist ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern. Im Jahre 1984 erhielten César Milstein und Georges Köhler für die Entwicklung dieser Technik den Nobelpreis für Medizin.

Zunächst wird ein Tier, beispielsweise eine Maus, mit dem Antigen immunisiert. Die Injektion des Antigens wird an mehreren Tagen wiederholt. Ist ein hoher Antikörpertiter erreicht, so wird die Milz entnommen, die B-Zellen isoliert und mit Myelomzellen fusioniert (An, 2010). Dieses Verfahren wird gewählt, da eine effiziente Kultivierung von B-Zellen in Zellkultur nicht möglich ist und diese nach einer gewissen Zeit in die Apoptose, den programmierten Zelltod, übergehen. Die Krebszellen hingegen unterliegen nicht dem programmierten Zelltod. Die Zellfusion kann auf verschiedene Weise erfolgen. Zum einen ist die Behandlung mit Polyethylenglycol (PEG) möglich. Dafür werden B- Zellen aus der Milz der Maus mit den Myelomzellen in eine PEG-haltige Fusionslösung gegeben. Diese wird anschließend zentrifugiert. Durch die hierbei entstehende räumliche Nähe der Zellen kommt es zu einer spontanen Fusion der Zellen (Zhang, 2012).

Da PEG eine toxische Wirkung auf die Zellen hat, wird auch eine zweite Methode verwendet. Bei der Elektrofusion werden die Zellmembranen von B-Zellen und Myelomzellen durch elektrische Impulse lokal aufgeschlossen, wobei es dann zu einer Verschmelzung der Zellen kommt (Schoeman et al., 2018). Das Hybrid aus B-Zelle und Myelomzelle ist somit in der Lage, sich fortwährend zu vermehren und dabei monoklonale Antikörper zu sezernieren. Durch die Fusion entstehen Hybride, die sowohl immortalisiert sind als auch monoklonale Antikörper produzieren (Parray et al., 2020; C. Zhang, 2012).

Im Weiteren werden in einem Screening diejenigen fusionierten Hybridomzellen isoliert, welche die gewünschten Antikörper in der erforderlichen Spezifität herstellen. Die Antikörperproduktion kann in vitro, aber auch in vivo erfolgen (Zaroff & Tan, 2019).

Abbildung 8: schematische Darstellung der Hybridomtechnik zur Herstellung von Antikörpern aus Maus Milz-B-Lymphozyten. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00347-010-2255-z#Fig1>



### 3.8 Immunoassay

Unter dem Oberbegriff Immunoassay werden verschiedene Methoden zusammengefasst, die durch Interaktionen von Antigen und Antikörper einen Nachweis von Biomolekülen oder chemischer Substanzen ermöglichen. Die Liganden-Bindung wird je nach Test durch verschiedene Markierungsoptionen detektiert (Luttmann et al., 2009).

Bei einem Fluoreszenz-Immunoassay werden Fluorophore als Marker eingesetzt, die über Fluoreszenzintensität die Quantifizierung ermöglichen. Wird diese Markierung mit radioaktiven Isotopen vorgenommen, so spricht man von einem Radioimmunoassay. Werden Enzyme eingesetzt, erfolgt die Quantifizierung durch den Umsatz eines Substrates (Kohl & Ascoli, 2017). Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wird den Enzymimmunoassays zugeordnet. Das Funktionsprinzip des ELISA kann in einen direkten oder indirekten Assay unterteilt werden. Man spricht von einem direkten Assay, wenn der gegen das Antigen gerichtete Antikörper mit einem Enzym markiert ist, wohingegen beim indirekten Assay ein zweiter Antikörper, der gegen den Antigen-spezifischen Antikörper gerichtet ist, das Enzym trägt. Des Weiteren lässt sich bei den Assay Prinzipien noch zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Assays (Sandwich-Assays) unterscheiden.

Bei einem Sandwich Assay werden zwei Antigen-bindende Antikörper eingesetzt (Abbildung 9,3). Hierbei ist es wichtig, dass die Antikörper gegen verschiedene Epitope des Antigens gerichtet sind. Ein Antikörper wird als Fangantikörper auf der festen Phase immobilisiert. Nach Bindung des Antigens aus der Probe an den Antikörper wird der zweite, enzymmarkierte Antikörper hinzugegeben und kann detektiert werden (Voller et al., 1978).

Bei einem kompetitiven Assay wird zu dem Analyten ein strukturell ähnliches Molekül hinzugegeben. Diese beiden konkurrieren um die Bindung an den Antikörper. Dieser kann entweder auf der festen Phase immobilisiert werden oder enzymmarkiert eingesetzt werden. Die Bindung des markierten Antigens/Antikörpers erfolgt umgekehrt proportional zur Konzentration des detektierten Antigens (Abbildung 9, 1,2). Somit wird bei vorwiegender Bindung des enzymmarkierten Antikörpers an die feste Phase eine hohe optische Dichte angezeigt. Erfolgt eine Konkurrenz, um die Bindung durch Analyten in der Probe, so mindert dies die Bindung des enzymmarkierten Antikörpers an die feste Phase. Dies zieht die Minderung der optischen Dichte nach sich. Zunahme der Konzentration des Analyten in der Probe führt somit zu einer Verminderung der OD.

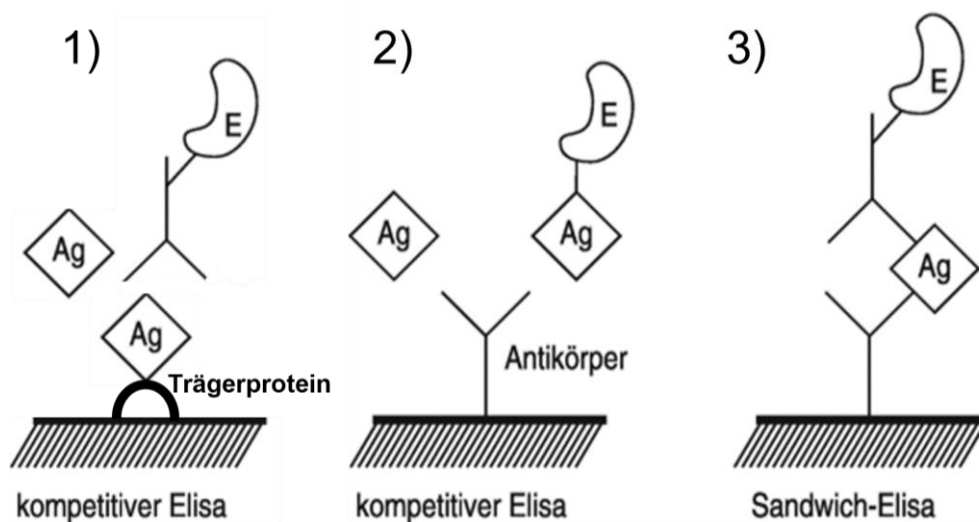


Abbildung 9: Mögliche Assayformate des ELISAs. Kompetitiver ELISA dargestellt in zwei Varianten. 1) Konkurrenz zwischen fester Phase und dem Standard. Antikörper in Lösung. 2) Konkurrenz in der flüssigen Phase. Antikörper ist an die feste Phase gebunden. 3) keine Konkurrenz um Bindung im Sandwich-ELISA Antikörper Paar auf der festen Phase und als Konjugat. Verändert nach:

[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48986-4\\_1548](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48986-4_1548)

Für die quantitative Auswertung eines Assays, die Bestimmung der Konzentration eines Analyten in einer Probe, wird eine Standardkurve erstellt.

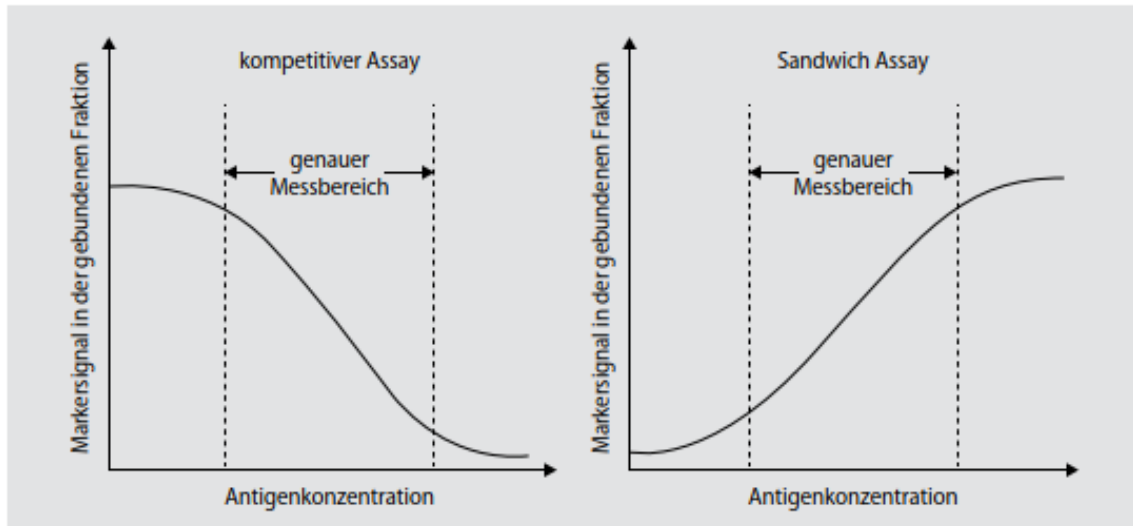


Abbildung 10: Vergleichende Darstellung von Standardkurven eines kompetitiven und eines Sandwich Assays. (Luttmann et al., 2014)

Hierfür werden Proben bekannter Konzentration (Standards) mit dem Assay abgearbeitet und mit den gemessenen optischen Dichten eine Konzentration-OD-Kurve erstellt (Köhler et al., 2015). Aus dieser Kurve kann die Konzentration des Analyten in einer unbekannt Probe anhand dessen OD aus der Kurve abgelesen beziehungsweise berechnet werden (Gey, 2015). Wie in Abbildung 10 zu sehen, weisen Assays einen sigmoidalen Kurvenverlauf auf, wobei bei kompetitiven Assays das Detektionssignal mit steigender Analytkonzentration sinkt und bei einem Sandwich-Assay das Signal mit Analytkonzentration steigt.

### 3.9 DRG:HYBRiD-XL®

Der DRG:HYBRiD-XL® ist ein von DRG Instruments GmbH entwickelter Analyser für eine automatisierte Durchführung von Immunoassays und Tests mit klinisch chemischen Parametern. Mit dem Gerät ist es möglich, Messungen von bis zu 40 Patientenproben mit bis zu 40 Tests innerhalb eines Laufes durchzuführen. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Tests den gleichen Ablauf haben. Für die Vorbereitung eines Laufes muss der Anwender lediglich die Patientenprobe sowie gebrauchsfertige Reagenzienkartuschen in das Gerät stellen, was eine einfache Handhabung und kurze Bedienzeiten erlaubt. Als Probe kann Serum, Plasma, Speichel, Urin oder Stuhl verwendet werden. Die Auswertung kann je nach Parameter quantitativ oder qualitativ bewertet werden (DRG Instruments GmbH, 2019).

Die für die Analysen benötigten Reagenzien sind für einen Assay „ready-to-use“ in einer sogenannten Cartridge enthalten. Für jeden Assay sind Reagenzien wie Enzymkonjugat, Substrat und Verdünnungspuffer in den drei Kavitäten einer Cartridge (TW1-3) luft- und lichtdicht verschweißt und mit Barcode versehen. Dieser enthält Informationen über den Ablauf des Assays, die Charge, sowie das Ablaufdatum. In die Cartridge ist auch das beschichtete Well (ACW) integriert, welches äquivalent zur festen Phase im manuellen ELISA ist. Werden zusätzliche Kavitäten für Reagenzien benötigt, werden rote zusätzliche Kartuschen (Additional

Cartridges) verwendet. Wird die Probe automatisiert auf dem Gerät verdünnt, so gibt es zusätzliche gelbe Verdünnungs-Kartuschen (Dilution Cartridges). Die Cartridges werden in Rahmen eingeklemmt, genannt Segmente und so im Rotor des DRG:HYBRiD-XL® platziert. Der Rotor des DRG:HYBRiD-XL® fasst fünf Segmente mit je acht Cartridges. In die Segmente werden auch die Küvetten, in welchen die Messung der optischen Dichte erfolgt, eingesteckt.

Es ist zu beachten, dass für den DRG:HYBRiD-XL® Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,5 cm verwendet werden, weshalb bei der photometrischen Bestimmung der Wert der optischen Dichte verdoppelt wird, und folglich höhere optische Dichten ausgegeben werden.

Die Rotorkammer wird konstant auf 37 °C gehalten. Die Proben, sowie Rekalibratoren und Kontrollen, befinden sich in der Probenkammer im unbeheizten Sample ARC (Probenarm). Es gibt zwei Arten von Sample ARCs, den Primary Sample ARC und den Secondary Sample ARC. Der Primary Sample ARC wird für die Messung direkt aus dem Probenröhrchen, wie beispielsweise Monovetten (13 und 16 mm Durchmesser) verwendet und fasst 12 Proben. Es besteht die Möglichkeit, wenn die Proben aus einem ARC pipettiert sind, ergänzende Proben aus einem zweiten und dritten Probenhalter nacheinander pipettieren zu lassen. Der Secondary Sample ARC mit 20 Probenplätzen ist für kleine Probenröhrchen mit 1 mL Fassungsvermögen geeignet. Auch hier ist ein ARC-Wechsel möglich, sodass nacheinander 40 verschiedene Proben pipettiert werden können.

Zusätzlich benötigt der DRG:HYBRiD-XL® noch die Systemflüssigkeit (destilliertes Wasser), Waschpuffer für die Waschprozedur und die Needle-Cleaning-Solution für die Reinigung der Nadel zwischen einzelnen Pipettierschritten, welche 0,125 M Natronlauge enthält. Im Analyzer sind zwei Pipetten integriert, die Pipettieradel und die Waschnadel für die Waschprozedur (DRG Instruments GmbH, 2019).

Die Parameter zur Durchführung des Assays und der Charge werden über den Assay-Barcode sowie den Barcode der Cartridges eingescannt, und der Testauftrag über den Touchscreen eingestellt. Der Assay-Barcode enthält Informationen über die Abarbeitung des jeweiligen Assays, wie Probenvolumen, Pipettierreihenfolge und Inkubationszeiten (2000-Sekunden Zyklen).

Nach Einstellen des Testauftrages wird das benötigte Probenvolumen berechnet, und die eingesetzten Cartridges über den aufgedruckten Barcode auf korrekte Anzahl und richtige Charge überprüft. Dies erfolgt durch integrierte Barcodescanner, die über dem Rotor angebracht sind. Sind die Cartridges gescannt und Proben sowie Reagenzien eingesetzt, beginnt der DRG:HYBRiD-XL® mit der 15-minütigen Aufheizphase und anschließend mit dem Start der Assay Prozedur. Mit der im Barcode der Charge integrierten Masterstandardkurve werden die Konzentrationen der Proben über die optische Dichte (645 nm Messwellenlänge / 450 nm Referenzwellenlänge) bestimmt (DRG Instruments GmbH, 2019).

Ein Kit der DRG Instruments GmbH enthält die Assay-Arbeitsanleitung, das Kit-Datenblatt, 40 Cartridges und zwei Rekalibratoren sowie zwei Kontrollen.



Vor der erstmaligen Messung von Proben muss für jedes Lot eine Rekalibrierung durchgeführt werden. Die Sollwertbereiche der Rekalibratoren und Kontrollen sind im Kit-Datenblatt im Barcode der jeweiligen Charge hinterlegt. Des Weiteren muss die Standardkurve erneut monatlich mit den zwei Rekalibratoren und zwei Kontrollen rekalibriert werden, um die Richtigkeit der gemessenen Konzentrationen zu gewährleisten (DRG Instruments GmbH, 2019). Die Rekalibrierung muss bei jeder neuen Charge desselben Assays erneut durchgeführt werden, da jede Charge ihre eigene Masterstandardkurve hat.

### 3.10 Auswertung der optischen Dichte mittels Standardkurve

Für jede Charge eines ELISA für den DRG:HYBRiD-XL® wird eine sogenannte Masterstandardkurve erstellt. Diese ergibt sich aus dem Mittelwert aus zehn Messungen von jedem Standardpunkt. Diese werden im Barcode hinterlegt. Für die Rekalibrierung der Standardkurve ist es auf dem Gerät nur nötig, die beiden Rekalibratoren, welche auf der Kurve liegen, zu messen. Anhand dieser Messung wird die Standardkurve individuell auf das Gerät angepasst. Um die Rekalibrierung zu prüfen, werden zwei Kontrollen mit Zielkonzentration gemessen (DRG Instruments GmbH, 2019).

In der Testentwicklung steht noch kein Barcode für den Assay zur Verfügung. Aus diesem Grund werden die Assay Parameter manuell über einen Laptop in eine spezielle Entwicklungs-Software (Hybrid XL Analytics) eingegeben, welche dann den DRG:HYBRiD-XL® anhand dieser Parameter steuert. Die Auswertung der Messergebnisse wird mit Hilfe der gemessenen optischen Dichten der Standards über das in Microsoft Excel integrierte Softwareprogramm Assay Fit Pro von Assay Cloud durchgeführt. Bei Anwendung der Entwicklungs-Software kann keine Mastercurve zur Quantifizierung verwendet werden. Daher wird in jedem Lauf eine Standardkurve erstellt.

Assay Fit Pro ermöglicht eine Auswertung der Standardkurve unter Verwendung verschiedener Funktionen zur Berechnung der Regressionsgeraden (z.B. Vier-Parameter-Rodbard, fünf-Parameter-logistische, lineare oder Punkt-zu-Punkt-Regression) (Smetsers, 2019). Die Auswertung der Standardkurve für nicht lineare Regression für ELISA erfolgt beim DRG:HYBRiD-XL normalerweise über die Vier-Parameter-Rodbard-Regression.

Im Folgenden (Gleichung 1) ist die Vier-Parameter-Rodbard-Regression nach *Rodbard (1974)* dargestellt (Rodbard, 1974):

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

Dabei wird  $a$  als die optische Dichte eine Konzentration von null angenommen. Die maximale OD wird als  $d$  benannt, dabei handelt es sich um den Standard mit der maximalen Konzentration. Der dritte Parameter, der berücksichtigt wird, ist der Wendepunkt der Kurve, also der Punkt, an dem die S- förmige Krümmung der Kurve erfolgt  $c$ . Der letzte zu berücksichtigende Punkt ist die Steigung der Kurve  $b$  (Vogel, 2020).

### **3.11 Testentwicklungsphasen für die Neuentwicklung von Assays in der DRG Instruments GmbH**

Die Neuentwicklung eines Assays unterliegt dem Qualitätsmanagementsystem der DRG Instruments GmbH, welches nach den Anforderungen der internationalen Norm DIN EN ISO 13485:2016 implementiert wurde. Die internationale Norm umfasst unter anderem Entwicklungsvorgaben für Medizinprodukte, unter welche In-vitro-Diagnostika wie ELISA fallen (DIN Deutsches Institut für Normung, 2016)

Die Neuentwicklung eines Assays bei der DRG Instruments GmbH ist in mehrere Entwicklungsphasen gegliedert, die den Zeitraum von der Idee des Produktes, über dessen Entwicklung bis zur Verkaufsfreigabe und damit Routine-Produktion umfassen. Die Inhalte und Vorgaben der einzelnen Phasen sind in sogenannten Milestones beschrieben, und der jeweilige Fortschritt der Testentwicklung wird als Zwischenbericht für jeden Milestone dokumentiert ( DRG Instruments GmbH, 2018). Eine Übersicht der Milestones ist in Abbildung 11 aufgeführt.

Nach der Ideenfindung des neuen Produktes werden im Zuge eines Strategieplanes die Zielqualitätsmerkmale und Anforderungen an den zu entwickelnden Test und der Zeitrahmen der Entwicklung definiert. Im Anschluss erfolgt mit Milestone I die Sammlung und Dokumentation der theoretischen Grundlagen, wie eine gründliche Literaturrecherche, theoretische Entwicklung eines möglichen Funktionsprinzips und Klärung rechtlicher Grundlagen. Nach dem Beschaffen aller nötigen Materialien für die Entwicklung (Milestone II) werden mit den ersten Vorversuchen (Milestone III) die Testprozedur, wie Inkubationszeiten,- und Temperatur, die Konzentration sowie Arbeitsverdünnungen der Reagenzien und Kreuzreaktionen mit strukturähnlichen Substanzen ermittelt und festgelegt.

Im nächsten Schritt (Milestone IV) erfolgt die Optimierung der zuvor ermittelten Testparameter. Sind die Anforderungen des Milestone IV erfüllt, werden im Rahmen des nächsten Milestones die beiden Funktionsmuster Prototyp 1 und Prototyp 2 des Assays durch die Forschung und Entwicklung und nach Übergabe an die Produktion in Milestone VI der dritte Prototyp durch die Produktion hergestellt. Die Prototypen durchlaufen in der Testentwicklung die technische Dokumentation, die eine Entwicklungsverifizierung und -validierung umfasst (Milestone VII und VIII). Durch diese ausführliche Erstellung der technischen Dokumentation werden alle Leistungsdaten des Tests erhoben und im Hinblick auf die Anforderungen der Norm überprüft. Zusätzlich werden Aspekte wie Gebrauchstauglichkeit und Sicherheitsanforderungen geprüft und betrachtet.

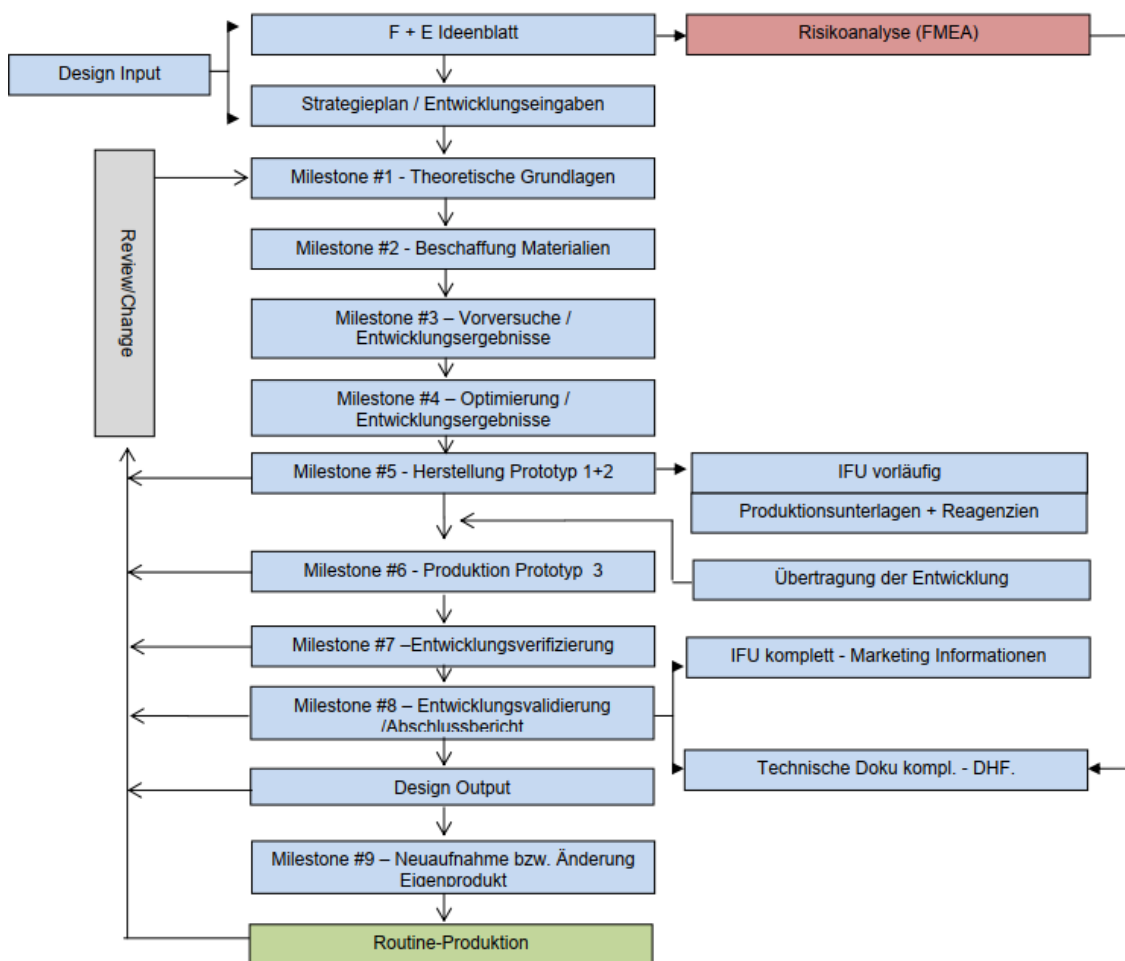


Abbildung 11: Prozessübersicht der Neuentwicklung eines Assays für den Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL bei der DRG Instruments (DRG, 2018).

Mit der Erstellung eines Abschlussberichtes, der abschließenden Bewertung der Entwicklungsvorgaben mit den Entwicklungsergebnissen und Fertigstellen eines Risiko-Management-Berichtes ist der achte Milestone abgeschlossen. Nach erfolgreicher Entwicklung des Tests durch die Abteilung Forschung und Entwicklung wird der Assays an die Produktion übergeben. Dabei werden alle für den Test verwendeten Reagenzien, sowie Proben für die Qualitätskontrolle an die Abteilungen Produktion und Qualitätskontrolle übergeben. Die Mitarbeiter erhalten alle Informationen im Rahmen einer Schulung durch den Entwicklungsverantwortlichen. Im Anschluss kann der neu entwickelte Assay als Produkt in das Portfolio der Assays für den Verkauf freigegeben werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

Die Entwicklung der Tests für die quantitative Analyse von Antibiotika im Serum wurden erfolgte in Kooperation mit der Firma CANDOR Bioscience GmbH in Wangen. Diese Firma entwickelt verschiedene Blockierungs-, Stabilisierungs- und Assay-Puffer, die in der IVD-Industrie Verwendung finden.

#### 4.1.1 Antibiotika

Im Rahmen der Test-Verifizierung werden verschiedene Versuche zur Kreuzreaktivität gegenüber strukturverwandten Antibiotika durchgeführt. Folgende Antibiotika wurden für die Verifizierung der Spezifität und die Assay-Entwicklung, sowie die Immunisierung im Rahmen der Antikörpergenerierung verwendet.

Tabelle 2: verwendete Antibiotika mit Lieferanten, CAS-Nummer und Bestellnummer. Die CAS-Nummer ist die Registrierungsnummer und internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe.

Nr.	Substanz	Firma	CAS-Nummer	Bestellnummer
1	Amoxillin	Sigma	26787-78-0	A8523-1G
2	Cefepime Di-HCl	Sigma	123171-59-5	Y0000633
3	Cefepime HCl	Sigma; aber eingestellt	107648-80-6	CDS022365-100MG
4	Cefixime Trihydrat	USP	125110-14-7	USP Ref 1097658
5	Cefotaxime Na-salt	Sigma	64485-93-4	C7039-100MG
6	Cefpodoxime	Supelco	80210-62-4	32344
7	Ceftazidim	Sigma	72558-82-8	CDS020667
8	Ceftriaxone Di-Na-salt	Sigma	105376-79-6	C5793-250MG
9	Flucloxacillin	Sigma	1847-24-1	SML-1023-10MG
10	Levofloxacin	Supelco	100986-85-4	40922-100MG
11	Linezolid related compound C	USP	168828-90-8	USP Ref 1367592-20MG

12	Linezolid	Sigma	165800-03-3	PZ0014-5MG
13	Meropenem Trihydrate	Sigma	119478-56-7	M2574-100MG
14	Moxifloxacin HCl	Sigma	186826-86-8	SML1581
15	Penicillin G Na-salt	Sigma	69-57-8	13752-1G-F
16	Piperazillin	Sigma	59703-84-3	P8396-10G
17	Tazobactam Na-salt	Sigma	89785-84-2	T2820-10MG
18	Tedizolid	Sigma	856866-72-3	AmBeed A139024-100MG

#### 4.1.2 Chemikalien

Tabelle 3: verwendete Chemikalien mit Lieferanten, CAS-Nummer und Bestellnummer. Die CAS-Nummer ist die Registrierungsnummer und internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe.

Substanz	Firma	Bestellnummer
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid	Sigma-Aldrich	341006-5GM
Citronensäure	Sigma-Aldrich	C0759
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA	106586
Hämocyanin aus Megathura crenulata (Napfschnecke)	Sigma-Aldrich	H7017-5X20MG
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA	P5655-1KG
MES -Lösung 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	Merck KGaA	M1317
Natriumborhydrid	Merck KGaA	806373
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA	S0751-100G
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich	71496-1Kg
N-Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich	130672-5G

Ovalbumin	Sigma-Aldrich	S7951
Peroxidase activated	Roche Diagnostics GmbH	11428861001
Probumin® Bovine Serum Albumin Universal Grade	Millipore Corporation	81-003-6
Sodium Chlorid (NaCl)	Merck KGaA	S9888-10Kg

### 4.1.3 Puffer

Aktivierungspuffer Antigen Konjugation

0,1 M MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid)

In 0,9% NaCl

pH einstellen auf 4,7

Tabelle 4: Puffer mit verschiedenen Anwendungsgebieten der Firma CANDOR Bioscience mit Bestellnummer und wichtigen Nutzungshinweisen.

Bestellnummer Candor	Name	Ready-to-use (J/N)	Funktion	einfrierbar (J/N)
100	Low Cross	Ja	Antikörper- und Probenverdünnungspuffer zur Minimierung von unspezifischen Bindungen, Kreuzreaktivitäten und Matrixeffekten bei Immunoassays	Ja
101	Low Cross mild	Ja		Ja
102	Low cross strong	Ja		Ja
300	Low Cross protein free	Ja		Ja
301	Low Cross mild protein free	Ja		Ja
302	Low Cross strong protein free	Ja		Ja
105	Sample Buffer	Ja	Probenpuffer für unproblematische Analyte	Ja
305	Sample Buffer protein free	Ja		Ja
110	The Blocking Solution	Ja	Blockierer für Kunststoffoberflächen wie ELISA Platten auf Casein-Basis	Ja
112	Plate Block	Ja	protein-freier Blockierer für Kunststoffoberflächen wie ELISA Platten	Ja
113	Smart Block	Ja	BSA-freier Blockierer auf Peptid-Basis für Kunststoffoberflächen wie ELISA Platten	Ja
115	BSA-Block	Ja	BSA-haltiger Blockierer für Kunststoffoberflächen wie ELISA Platten	Ja
120	Coating Buffer pH 7,4	Nein (10x)	Beschichtung von Kunststoffoberflächen wie ELISA Platten	Ja
121	Coating Buffer pH 9,6	Nein (10x)		Ja

130	Antibody Stabilizer Tris	Ja	Stabilisierungslösung zur Langzeitlagerung von Proteinen oder Antikörpern bei 2-8°C	Nein
131	Antibody Stabilizer PBS	Ja		Nein
330	Antibody Stabilizer PBS protein free	Ja		Nein
331	Antibody Stabilizer PBS protein free	Ja		Nein
160	Liquid Plate Sealer	Ja	Stabilisierer für beschichtete Antikörper und Antigene auf Polystyrol- oder Glasoberflächen	Ja
162	Liquid Plate Sealer Plus	Ja		Ja
163	Liquid Plate Sealer animal free	Ja		Ja
200	Low Cross HRP	Ja	Verdünnungspuffer für die Langzeit-Lagerung von Peroxidase-Konjugaten sowie zur Minimierung von unspezifischen Bindungen, Kreuzreaktivitäten und Matrixeffekten in Immunoassays.	Ja
270	Low Cross HRP- Stab	Ja		Ja
370	Low Cross HRP- Stab protein free	Ja		Ja
371	Low Cross HRP mild protein free	Ja		Ja
372	Low Cross HRP-Stab strong protein free	Ja		Ja
220	HRP Protector Tris	Ja	Langzeitlagerung von Peroxidase-Konjugaten	Nein
222	HRP Protector	Ja		Ja
320	HRP Protector Tris protein free	Ja		
322	HRP Protector protein free	Ja		
936	HRP Protector Tris +3% BSA	Ja		
228	Tracer HRP Stab	Ja		Ja
328	Tracer HRP Stab protein free	Ja		Ja

Beschichtungspuffer

Diese Puffer wurden aus der Routineproduktion entnommen. Die genaue Rezeptur liegt bei DRG Instruments GmbH.

Citratpuffer pH 4,2

64 mM Phosphatpuffer  
Zitronensäure

Phosphatpuffer 7,2 / PBS

siehe PBS

Carbonatpuffer pH 9,6

48mM Carbonatpuffer

Phosphatgepufferte Salzlösung

20x PBS 1L

NaCl 160g  
KCl 4g



Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                    28,8g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                    4,8g  
Ad H<sub>2</sub>O dest.

1x PBS 1L

20x PBS                    50mL  
Ad H<sub>2</sub>O dest.  
Einstellen des pH-Wert aus 7,2

### 4.1.3.1 Standardmatrix

Stammlösung

Di-Natriumhydrogenphosphat Puffer 0,1M  
12 g Di-Natriumhydrogenphosphat  
Ad 1 L H<sub>2</sub>O dest.  
pH einstellen auf pH 5,5

Standardmatrix Linezolid

Stammlösung Standardmatrix 1: 5 in H<sub>2</sub>O dest.  
→Di-Natriumhydrogenphosphat Puffer 0,02M (20mM)  
pH einstellen auf pH 6

Standardmatrix Ceftazidim

Stammlösung Standardmatrix 1: 5 in H<sub>2</sub>O dest.  
→Di-Natriumhydrogenphosphat Puffer 0,02M (20mM)  
+ 1% BSA MILLIPORE  
pH einstellen auf pH 5,5

Blockierung und Stabilisierung der Platten

Plate Sealer animal free CANDOR Bioscience GmbH  
1: 2 H<sub>2</sub>O dest.

Weitere Reagenzien

BioFX® TMB Super Sensitive One Component HRP

- Microwell Substrate Surmodics IVD, Inc.; TMBS-1000

### 4.1.4 **Antikörper**

Im Rahmen dieses Projektes fand eine Kooperation mit der Firma SynAbs S.A in Gosselies, Belgien, statt.

Die dort hergestellten Antikörper gegen Linezolid und Ceftazidim wurden für die Entwicklung der Assays in der DRG Instruments GmbH ausgetestet, aufgereinigt und gelabelt.

Zuvor fand eine Auswahl der besten Klone über die Untersuchung der Zellkulturüberstände (Tabelle 5, Tabelle 6) statt.

Tabelle 5: Zellkulturüberstände von verschiedenen Klonen Maus anti- Cefprozid. Abnahmedatum 04.03.20.

Projekt	BATCH		Datum	Klon Nummer
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL26
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL27
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL28
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL29
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL30
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL31
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL32
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL33
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL34
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL35
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL38
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL39
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL40
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL41
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL42
DRG/CEFTA	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL43

Tabelle 6: Zellkulturüberstände von verschiedenen Klonen Maus anti-Linezolid. Abnahmedatum 04.03.20.

Projekt	BATCH		DATUM	Klon Nummer
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL1
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL2
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL4
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL5
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL6
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL7
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL8
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL9
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL10
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL11
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL12
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL13
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL14
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL15
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL16

DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL17
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL18
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL19
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL20
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL21
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL22
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL23
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL24
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL25
DRG/LINE	FYN193M	HAT10F5H	04.03.20	CL36

Sekundäre Antikörper zur Isotypen Analyse der Klone

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper zur Isotypen Analyse der Antikörperklone. Hergestellt von der Firma SynAbs

Bezeichnung	Isotyp	Hersteller
LO-MG1-2	IgG1	SynAbs
LO-MG2a-3	IgG2a	SynAbs
LO-MG2b-2	IgG2b	SynAbs
LO-MG3-13	IgG3	SynAbs
LO-MM-8	IgM	SynAbs
LO-MK1	kappa	SynAbs

Antikörper Ceftazidim

*Diese Information ist von der Veröffentlichung ausgeschlossen.*

Antikörper Linezolid

*Diese Information ist von der Veröffentlichung ausgeschlossen.*

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Antigen-Design

Als erster Schritt zur Immunisierung eines Tieres steht das Antigen Design. Dafür ist es wichtig, das passende Antigen für den zu entwickelnden Test auszusuchen. Hierbei ist darauf zu achten, an welchem Punkt am Antigen das Trägerprotein angebracht werden kann, um zu vermeiden wichtige Strukturen des Antigens zu maskieren.

### 4.2.2 Antigen-Kopplung an Trägerproteine

*Diese Information ist von der Veröffentlichung ausgeschlossen.*

### 4.2.3 Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte für beide Antibiotika bei der Firma SynAbs. Dazu wurden je vier Balb -C Mäuse und sechs Lou Ratten immunisiert.

Tabelle 8: Immunisierungsprotokoll für die Balb-C Mäuse. Immunisierung mit BSA-Linezolid/ Ceftazidim und KLH- Ceftazidim und Linezolid.

Day	Maus1-BSA	Maus2-BSA	Maus1-KLH	Maus2-KLH
1. Immunisierung Tag 0	BSA-Ceftazidim BSA-Linezolid	BSA-Ceftazidim BSA-Linezolid	KLH-Ceftazidim KLH-Linezolid	KLH-Ceftazidim KLH-Linezolid
2. Immunisierung Tag 15	BSA-Ceftazidim BSA-Linezolid	BSA-Ceftazidim BSA-Linezolid	KLH-Ceftazidim KLH-Linezolid	KLH-Ceftazidim KLH-Linezolid
3. Immunisierung Tag 30	BSA-Ceftazidim BSA-Linezolid	BSA-Ceftazidim BSA-Linezolid	KLH-Ceftazidim KLH-Linezolid	KLH-Ceftazidim KLH-Linezolid
Immunisierungskontrolle an Tag 30 ELISA				
Boost Day 35	⊗	KLH-Linezolid	⊗	KLH-Ceftazidim → Kontrolle → erneuter Boost: KLH
Fusion 38	⊗	☑	⊗	☑
1. Screening der Zellkulturüberstände ohne Kompetition				

2. Screening der Zellkulturüberstände mit freiem Antibiotikum (Kompetition)
Weitere Kultivierung der Klone, die eine Reaktion auf freies Antibiotikum hatten (10mL) für weitere Testungen bei DRG Instruments GmbH
Screening der Klone DRG Instruments GmbH
Auswahl der Klone für die Antikörperproduktion
Isotypisierung der ausgewählten Klone
Produktion des Antikörpers zur Testentwicklung

Die Immunisierung der Mäuse und Ratten erfolgte intraperitoneal an Tag 0 und noch einmal an Tag 15. Auch an Tag 30 wurde eine Injektion mit den Konjugaten durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Tiere die BSA-Konjugate beider Antibiotika injiziert, wie weitere Tiere erhielten die KLH-Konjugate für beide Antibiotika.

An Tag 30 erfolgte eine Blutabnahme. Das so gewonnene Antiserum der Tiere wird mit einem Elisa überprüft.

Direkter ELISA zum Screening zur Immunisierungskontrolle

Die Plattenbeschichtung erfolgte mit je 5 µg/mL BSA, KLH, BSA-Ceftazidim, BSA-Linezolid, KLH-Ceftazidim und KLH-Linezolid.

Nach der Aufarbeitung der Blutprobe wurde eine lineare Verdünnung der Antiseren von 1:500 bis 1/512000 durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Blank (PBS) gemessen.

Wie in Tabelle 9 beschrieben wurden je 100 µL der verdünnten Antiseren auf die unterschiedlich beschichteten Platten gegeben und nach einem Waschschrift mit einem sekundären Antikörper (anti-Maus-HRP) detektiert. Die Detektion des Antikörpers erfolgte mit TMB. Nach der Zugabe der Stopplösung wurde bei 450 nm gemessen.

Tabelle 9: Ablaufschema der ersten Testung der Antiseren aus den Immunisierten Mäusen und Ratten bei der Firma SynAbs.

100µL	Verdünnte Antiseren (1:500 bis 1/ 512000) und Blank
30 min	Inkubation RT
waschen	Waschpuffer
100µL	Anti-Maus- HRP (LO-MG1-13 HRP) 1:3000
20 Min	Inkubation RT
waschen	Waschpuffer
100µL	TMB
100µL	Stopplösung
Messung	450nm

Maus2-BSA erhielt vor der Fusion (4.2.4) eine Boosterinjektion mit KLH-Linezolid, da sich in der Immunisierungskontrolle zeigte, dass die Immunisierung mit diesem Konjugat deutlich mehr Signal generierte als die mit BSA immunisierten Tiere.

Die Maus1-KLH wies bei der Immunisierungskontrolle die höchsten Titer für Ceftazidim auf und wurde mit KLH-Ceftazidim geboostert, um den Titer für Ceftazidim zu festigen. Dies geschah an Tag 40 und erneut an Tag 64. Anschließend wurde erneut eine Kontrolle der Immunisierung durchgeführt.

Da in der Kontrolle des Hybridoms nach der Fusion erkannt wurde, dass Maus-2 BSA keine in der Funktion richtigen Klone gegen Linezolid hervorgebracht hatte, wurde eine erneute Boosterung der Maus-1 KLH mit KLH-Linezolid durchgeführt, um die Möglichkeit zu vergrößern aus dieser Maus Klone gegen beide Antibiotika zu erhalten.

### 4.2.4 Fusion

Vor der Fusion werden die Tiere noch einmal wie in (4.2.3) beschrieben geboostert. Die Fusion der Milz Lymphknoten Zellen wird durch Elektrofusion durchgeführt.

Als Zelllinie wurde die IR-983-Myelom-Zelllinie verwendet. Nach der Fusion werden die Zellen vereinzelt und in 96-Well Platten überführt. Nach zwei Wochen werden die Überstände der Hybridome auf einem ELISA getestet.

### 4.2.5 Screening

#### 4.2.5.1 Screening SynABs

Das Screening der Klone erfolgte in zwei Phasen. Zunächst wurden die gewachsenen Zellkulturen anhand der Färbung des Kulturmediums identifiziert. Sobald die rote Farbe des Kulturmediums (Phenolrot) aufgrund eines sauren pH-Wertes der Stoffwechselprodukte wachsender Hybridomzellen in eine gelbe Färbung wechselte, wurden die Kulturüberstände abgenommen.

#### Hybridoma aus Maus- 2 BSA

Es folgte der erste Screening-Test für die Klone der Maus 2-BSA (BSA und KLH immunisiert). Für die Testung wurde zunächst eine Platte mit 5 µg/mL KLH-Linezolid beschichtet, da nur eine Immunisierungsinjektion KLH enthielt. 2000 Hybridoma-Überstände wurden auf Reaktion getestet. Alle Hybridome, die hier eine Reaktion zeigten, wurden in einem zweiten Screening-Durchlauf erneut getestet.

Dafür wurde erneut 5 µg/mL KLH-Linezolid auf die Platte gegeben, zusätzlich wurde aber auch 1 mg/mL Linezolid hinzugegeben, um die Bindung an das freie Linezolid zu simulieren.

Nur Klone, die beide Screening-Durchläufe bestanden haben, sprich eine Reaktion zeigten, werden in die engere Auswahl genommen.

Es wurden keine Klone gefunden, die freies Linezolid binden, deshalb wurde nach erneuter Boosterung der Maus1-KLH ein Screening für die Detektion von Klonen sowohl gegen Linezolid als auch Ceftazidim durchgeführt.

Hybridoma aus Maus 1-KLH

Die Klone der mit KLH-Antigen immunisierten Maus (Maus1-KLH) wurden ebenso getestet. Anstelle der KLH-Antigene, die bei dieser Maus zur Immunisierung eingesetzt wurden, wurden hier die BSA-Antigene für das Screening verwendet.

Der Ablauf des Screenings erfolgte wie bei den Hybridoma-Überständen von Maus-2-BSA. Ebenso wurde im zweiten Screening Durchgang die Bindung an freies Ceftazidim und Linezolid getestet.

Die in dem Screening bei SynAbs als positiv bewerteten Klone für Linezolid und Ceftazidim wurden an die DRG Instruments GmbH verschickt.

Für das Screening in der Firma DRG wurden 25 Klone für Linezolid und 18 Klone gegen Ceftazidim genutzt (Tabelle 5, Tabelle 6).

4.2.5.2 Screening DRG Instruments GmbH

Ceftazidim

4.2.5.2.1 Plattenbeschichtung Ceftazidim

Für die Durchführung der Screeningversuche wurden Mikrotiterplatten mit 1µg/mL BSA. Ceftazidim, wie ich Tabelle 10 aufgeführt, beschichtet

Tabelle 10: Ablaufschema der Beschichtung der Platten für das Screening der Zellkulturüberstände für anti-Linezolid/anti-Ceftazidim bei DRG Instruments GmbH.

100µL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BSA- Ceftazidim in PBS pH 7,2</li> <li>• BSA-Linezolid in PBS pH 7,2</li> </ul>
über Nacht 4°C	
1x	waschen mit verdünntem Waschpuffer (TWP)
Platten direkt verwendet nur Trocknung - keine Stabilisierung	

4.2.5.2.2 Direkter ELISA mit Zellkulturüberständen für Ceftazidim

Anschließend wurden die 18 Klone, die von SynAbs als kompetitiv erkannt wurden, seriell verdünnt. Als Verdünnungsmedium wurde PBS verwendet. Die Zellkulturüberstände wurden 1:25 bis 1:1600 verdünnt.

Von dieser verdünnten Lösung wurden, wie in 100 µL in das Well eine 96er-well Platte gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Well gewaschen. Die Detektion des Antikörpers im Zellkulturüberstand erfolgte mit einem anti-Maus-HRP sekundär Antikörper. Alle Klone, deren OD bei einer Verdünnung von 1:25 kleine 1,0 OD lagen, wurden aussortiert. Für die übrigen Klone wurde eine Arbeitskonzentration festgelegt, die etwa eine OD von 2,0 OD ergeben sollte. Dabei wurde beachtet, dass sich die Durchführung im kompetitiven ELISA ändert und dort ein Verhältnis von 1:2 vorliegt (Tabelle 11).

4.2.5.2.3 Kompetitiver ELISA mit Zellkulturüberständen und freiem Antibiotikum für Ceftazidim  
Es wurde eine Verdünnungsreihe des Antibiotikums Ceftazidim hergestellt, welche von 0 ng/mL bis 960 ng/mL reichte. Diese Lösungen, in PBS, wurden für die Austestung der Bindung von freiem Ceftazidim im Testbereich bis 960 ng/mL genutzt.

Dafür wurden die mit 1 µg/ml BSA-Ceftazidim beschichteten Platten mit je 50µL verdünntem Zellkulturüberstand und 50 µL der Antibiotika-Lösung pro Vertiefung versehen. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Platte 3x gewaschen (TWP). Anschließend erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (anti-maus-HRP).

Nach einer erneuten Inkubation von 30 min und dem darauffolgenden Waschen der Mikrotiterplatte erfolgte die Detektion mit TMBS.

Klone, die auch dieses Screening absolviert haben, und eine adäquate, aber nicht zu sensitive Reaktion auf das freie Antibiotikum zeigten, wurden in einem finalen Assay auch mit nativen Proben vermessen, um eine Interferenz zwischen den in Puffer gelöstem und dem nativ im Serum vorhandenen Antibiotika auszuschließen.

Die ausgewählten Klone sollten zum einen in der gewählten Verdünnung eine OD von ca. 1,8-2,0 OD zeige. Zudem sollte die Ratio von S0 (Puffer ohne Analyt) und S1 nicht weniger als 60 % betragen, jedoch auch nicht mehr als 80 % um die Sensitivität zu gewährleisten.

Tabelle 11: Durchführungsprotokoll der ELISAs der Screening Versuche. Gezeigt ist das Protokoll für den direkten ELISA ohne Konkurrenz und dem kompetitiven Format mit freiem Antibiotikum.

Direkter ELISA ohne Konkurrenz	Kompetitiver ELISA mit freiem Antibiotikum
100µL Zellkulturüberstand (in versch. Verdünnungen)	50 µL Zellkulturüberstand in versch. Verdünnungen + 50µL freies Antibiotikum (in versch. Konzentrationen)
1 h Inkubation bei Raumtemperatur	
3x waschen mit verdünnter Waschlösung 100µL anti-Maus IgG-HRP 3x waschen mit verdünnter Waschlösung 100µL TMBS	
5-15 min Inkubation	15 min Inkubation
100 µL Stopp-Lösung Messung bei 450 nm/ 630 nm	



### Linezolid

#### 4.2.5.2.4 Plattenbeschichtung für Linezolid

Die Plattenbeschichtung für die Austestung der Linezolid Zellkulturüberstände wurde wie in Tabelle 10 beschrieben durchgeführt.

#### 4.2.5.2.5 Direkter ELISA mit Zellkulturüberständen für Linezolid

Mit den Zellkulturüberständen der Anti-Linezolid Hybridoma wurde wie mit den anti-Ceftazidim Klonen verfahren. Die Durchführung des direkten ELISAs wurde wie in Tabelle 11 aufgeführt abgearbeitet.

Alle Klone, deren OD bei einer Verdünnung von 1:50 kleiner 1,0 OD lagen, wurden aussortiert. Für die übrigen Klone wurde eine Arbeitskonzentration festgelegt, die etwa eine OD von 2,0 OD ergeben sollte. Dabei wurde beachtet, dass sich die Durchführung im kompetitiven ELISA ändert und dort ein Verhältnis von 1:2 vorliegt (Tabelle 11).

#### 4.2.5.2.6 Kompetitiver ELISA mit Zellkulturüberständen und freiem Antibiotikum für Linezolid

Die Verdünnungsreihe des Antibiotikums Linezolid wurde bis zu einer Konzentration von 350 ng/mL hergestellt und eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie für die Austestung der Zellkulturüberstände des Ceftazidims nach Tabelle 11.

#### 4.2.5.3 Bestimmung der Isotypen der ausgewählten Antikörper für Ceftazidim und Linezolid

Zusätzlich wurde für die final ausgewählten Klone des Ceftazidims und des Linezolid eine Isotypisierung durchgeführt.

Dafür wurde eine 96-Well Platte mit 5 µg/mL Linezolid-BSA / Ceftazidim-BSA beschichtet. Anschließend wurden die Überstände der jeweils vier gewählten Klone auf die Platte gegeben. Die Detektion erfolgte mit Isotyp-spezifischen Antikörpern (Tabelle 7). Auf Grundlage der Ergebnisse der Isotopen Analyse wurden zwei Antikörper pro Antigen für die Produktion bei SynAbs in Auftrag gegeben.

#### 4.2.6 Protein A/G Aufreinigung

Zur Affinitätsaufreinigung der monoklonalen Antikörper aus einem Zellkulturüberstand (ZKÜ) wird eine Protein A/G Säule verwendet.

Durch spezifische Wechselwirkungen zwischen der Fc-Region der IgGs im ZKÜ und dem immobilisierten Protein A kommt es zu einer Bindung dieser an die Säule.

Protein A kommt in der Natur in der Zellwand des *Staphylococcus Aureus* vor, wird aber nun chemisch hergestellt. Mit dem Verfahren kann eine Aufreinigung von bis zu 95 % erreicht werden. Dafür wurden 5 mg Protein A/G in eine Gravitationssäule gepackt. Diese wird dann an eine Pumpe angeschlossen, die auf ein Durchflussvolumen von 0,4 mL/min eingestellt wird. Die Equilibrierung der Säule erfolgt mit 1x PBS, welches mit dem 10-fachen Säulenvolumen (5 mL) über diese laufen gelassen wird. Dafür wird die Pumpe auf 10-fache Geschwindigkeit gestellt. Anschließend wird der ZKÜ an die Pumpe angeschlossen und in der zuvor eingestellten Geschwindigkeit von 0,4 mL/ min über die Säule geleitet. Dabei ist zu beachten, dass 1 mg Protein A Material etwa 25 mg Protein binden kann. Ist der ZKÜ vollständig über die Säule gelaufen, wird erneut mit PBS gespült. Dies wird so lang fortgesetzt bis der Durchfluss bei einer photometrischen Messung bei 280 nm eine optische Dichte von 0 ergibt. Währenddessen wird die Eluierung der IgGs vorbereitet. Dafür wird für eine Fraktionsgröße von 1 mL jeweils 100 µL 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> vorgelegt, sodass der mit pH 3,0 eluierte Antikörper direkt neutralisiert wird. Für die Elution wird 0,1 M Glycin/HCL (pH 3,0) verwendet.

Abschließend wird jede Fraktion bei 280 nm photometrisch gemessen. Fraktionen ab einer OD von 0,1 OD werden zunächst gesammelt. Die Elution wird fortgesetzt, bis die OD einer Fraktion unter 0,1 OD fällt.

Abschließend wird ein Pool der Antikörper-Eluate erstellt und die Konzentration unter zur Hilfenahme des Lambert-Beer'sche Gesetz berechnet.

Formel 2

$$\lg \frac{I^0}{I} = E = \varepsilon * c * d$$

$I_0$  = Intensität des eingestrahnten Lichts  
 $I$  = Intensität nach Passieren der Küvette  
 $E$  = Extinktion  
 $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient  
 $c$  = Konzentration [mol/L]  
 $d$  = Schichtdicke der Küvette [cm]

Die verwendete Küvette hat eine Schichtdicke von 1cm, wodurch sich die Formel vereinfachen lässt.

Formel 3

$$E = \varepsilon * c$$

So wird deutlich, dass eine direkte Proportionalität zwischen der Konzentration und der gemessenen Extinktion besteht. Der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  von IgG liegt bei 1,35.

Ermittlung der IgG-Konzentration erfolgt also wie folgt:

Formel 4

$$C = \frac{E}{1,35}$$

### 4.2.7 Konjugation von Antikörper an HRP

Die Konjugation der Antikörper für Linezolid und Ceftazidim mit Meerrettichperoxidase (HRP) wurde basierend auf der Produktinformationen für die aktivierte Peroxidase von Roche Diagnostics GmbH durchgeführt.

Folgende Puffer wurden angesetzt:

- Puffer 1: 100 mM Natriumcarbonat/-hydrogencarbonat-Lösung, pH 9,8
- Puffer 2: 2 M Triethanolamin-Lösung, pH 8,0
- Puffer 3: 200 mM Natriumborhydrid-Lösung (frisch ansetzen und auf Eis kühlen)
- Puffer 4: 1 M Glycin-Lösung, pH 6,2 (statt Angabe pH 7,0)

Die Konjugation wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

1. Umpuffern der Antigenlösung:
  - Äquilibrieren der NAPTM-5 Säule mit Puffer 1
  - Auftrag der Antigenlösung und Elution in Fraktionen
  - Photometrische Messung bei 280 nm: Verwerfen aller Fraktion unter OD 0,1

Die Ermittlung der Antigenkonzentration im Eluat erfolgte über das Lambert-Beer'sche-Gesetz (Formel 2).

Der Extinktionskoeffizient des Antikörpers wurde über die photometrische Messung (280 nm) der Antigenlösung bestimmt (Formel 4).

2. Konjugation:
  - Lösen des HRP-Lyophilisates in H<sub>2</sub>O dest. (5 mg Lyophilisat enthält 1 mg HRP)
  - Gelöste HRP in den Antigenansatz geben (Molarer HRP Überschuss: 0,8-fach und 3 h bei RT inkubieren).

Das Molekulargewicht von HRP laut Herstellerangabe: - HRP: 44 kDa.

Reaktionsstopp

- Zugabe von Puffer 2 und 3 zum Kopplungsansatz
- Anteil bezogen auf das gesamte Kopplungsvolumen:
  - Puffer 2: 10 %
  - Puffer 3: 9 %

- Inkubation: 30 min bei 4 °C
- Erneute Zugabe von Puffer 3 (50 % des zuvor gegebenen Volumens)
- Inkubation: 2 h bei 4 °C
- 3. Stabilisieren des Kopplungsansatzes
  - Zugabe von Puffer 4: 2 % bezogen auf das Gesamtvolumen
  - Inkubation: 1 h bei 4 °C
- 4. Umpuffern des Kopplungsansatzes
  - Äquilibrieren der NAPTM-10 Säule mit PBS
  - Auftrag des Kopplungsansatzes und Elution in Fraktionen
  - Photometrische Messung bei 280 nm: Verwerfen aller Fraktion unter OD 0,1.
- 5. Bestimmung der Endkonzentration
  - Photometrische Messung bei 280 nm und 403 nm
  - Berechnung über das Lambert-Beer'sche-Gesetz
- 6. Stabilisierung zur Lagerung
  - 1:2-Verdünnung des Eluates in StabilZyme® HRP Conjugate Stabilizer

### 4.2.8 Vorversuche zur Testentwicklung

Zu Beginn der Testentwicklung werden die Parameter des Tests abgesteckt. Dazu gehören Volumina, Inkubationszeiten, Verdünnungen von Stocklösungen, Auswahl von Puffern. Puffer haben unterschiedliche Aufgaben. Zum einen stabilisieren sie den pH- Wert der Lösungen. Zum anderen können sie den Abbau von kritischen Komponenten wie Antikörpern, Enzymen oder Antibiotika verhindern. Des Weiteren ist es wichtig verschiedene Puffer für Standards und Konjugat zu testen, darüber hinaus sind die Verdünnungen der Komponenten festzulegen. Im Vorfeld wurde festgelegt, dass sich das Format eines kompetitiven ELISAs für die Detektion der Antibiotika in Serum am besten eignet.

#### 4.2.8.1 Beschichtung der Mikrotiterplatten

##### Ceftazidim

Um zu prüfen, welche Beschichtungskonzentration des Antikörpers nötig ist, wurde eine Titration dieser durchgeführt. Es wurden Konzentrationen von 2 µg/mL bis 0,75 µg/mL getestet. Die Beschichtung mit dem Antikörper auf der Platte wurde nur mit PBS durchgeführt.

Da ein Wechsel des Testformats für den Ceftazidim-ELISA nötig war, wurde auch die Beschichtung mit BSA-Ceftazidim geprüft. Hier wurde zusätzlich der pH-Wert der Puffer alterniert. Es wurden drei verschiedene Puffer für die Titration der Beschichtung verwendet. Zum einen ein Citratpuffer mit einem pH von 4,2, ein Phosphatpuffer pH 7,2 und einen Carbonatpuffer mit einem pH-Wert von 9,8 (4.1.3).

Die Beschichtung erfolgte hier von 2,0 µg/mL – 0,5 µg/mL.

Das Protokoll der Beschichtung ist Tabelle 12 zu entnehmen.

Linezolid

Dafür wurden die Entwicklung des Linezolid Assays wurde auch zunächst die Antikörperbeschichtung der Platte geprüft. Hier wurde eine Titration von 4 - 0,06 µg/mL in PBS pH 7,2 durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der Testformate herstellen zu können, wurde die Optimierung auch für die Beschichtung mit BSA- Linezolid durchgeführt. In diesem Experiment wurde die Titration von 4,0 µg/mL bis 0,5 µg/mL durchgeführt. Der Einfluss des pH-Wertes des Beschichtungspuffers wurde ebenfalls geprüft. Hier wurde die Beschichtung in pH 5,5, pH 7,2 und pH 9,6 begutachtet.

Die Beschichtung der Platten erfolgte nach folgendem Schema in Tabelle 12.

Tabelle 12: Schema der Arbeitsschritte der Plattenbeschichtung

100 µL/well	der verdünnte Antikörper in Puffer (pH 7,2) des verdünnten BSA-Antibiotika Konjugat in Puffer (pH 4,2  pH 7,2  pH 9,8)
Inkubation	über Nacht bei 4°C
waschen	1x 300 µL/well mit verdünnten Waschpuffer (TWP)
200 µL/well	Stabilisierungslösung
Inkubation	1 h bei Raumtemperatur
Trocknen	Ausklopfen und Trocknen über Nacht

4.2.8.2 Testkomponenten

Der Aufbau des Tests kann auf zwei Arten erfolgen. Der Antikörper kann als Fänger auf der festen Phase verwendet werden, er kann aber auch enzymmarkiert zur Detektion eingesetzt werden.

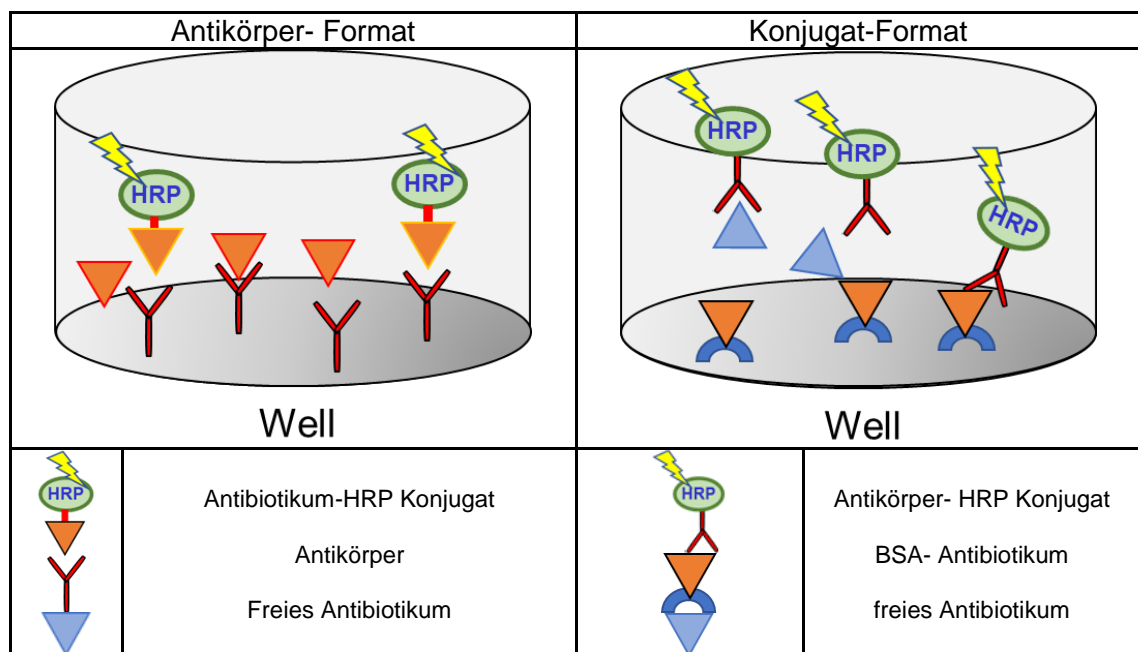


Abbildung 12: Schematische Darstellung der unterschiedlichen kompetitiven Testformate die in der Optimierung Anwendung finden.

Die in Versuch 0 verwendeten Platten werden mit einer Schachbretttitration mit absteigenden Konjugatkonzentration gemessen. Dieses Experiment wird mit dem enzymmarkierten- Antikörper Konjugat auf der BSA- Antibiotika Mikrotiterplatte und mit dem Antibiotika-HRP Konjugat auf der Antikörper-beschichteten Platte durchgeführt.

Bei der Schachbretttitration können zwei Parameter gleichzeitig untersucht werden. Die Konjugatkonzentration (Antibiotika-HRP oder Antikörper-HRP) wird in Vertikaler Richtung schrittweise reduziert. Dafür wurde jeweils eine 1:2 Verdünnung durchgeführt.

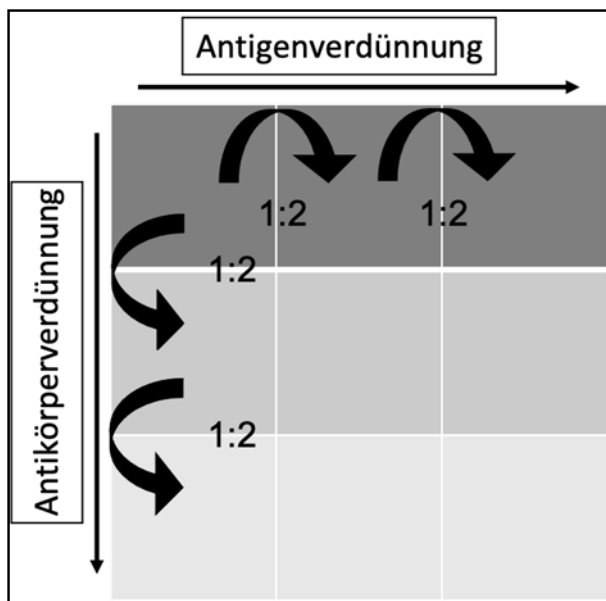


Abbildung 13: schematische Darstellung der Schachbretttitration

In horizontaler Richtung wird die Antigenkonzentration (BSA-Antibiotika oder Antikörper) schrittweise reduziert.

Anhaltspunkte für die Startverdünnung lieferten Ergebnisse der Austestung der Zellkulturüberstände in 4.2.5.

### Ceftazidim

Die Komponenten des Ceftazidim ELISAs wurden auf dieselbe Weise untersucht. Die Konzentration der Plattenbeschichtung wurden, wie in 0 beschrieben, übernommen.

Für die Verwendung des Antikörper-Formats wurde eine Titration mit dem Antibiotikum- HRP Konjugat durchgeführt. Diese wurde in einer Verdünnung von 1:50.000 bis 1:200.000 durchgeführt. Was einen Konzentrationsbereich von 20 ng/mL bis 5 ng/mL beschreibt. Für das Antikörper-HRP Konjugat, welches für das Antikörper-HRP-Testformat verwendet wird, wurde in einer Verdünnung von 1:15000 bis 1:30000 durchgeführt, was einer Konzentration von 7,89 ng/mL bis 3,98 ng/mL.

Auch die Inkubationszeit der Probe mit dem Konjugat hat einen Einfluss auf die Bindung. Der Assay wurde mit einer Probeninkubation von 30 min und von 1 Stunde durchgeführt. Die Substratinkubation wurde immer bei 15 min belassen.

### Linezolid

Für die Austestung der Komponenten für Linezolid wurden die in 0 beschriebenen Konzentrationen der Plattenbeschichtung eingesetzt. Für das Linezolid-HRP Konjugat (Stocklösung 1 mg/mL) wurden Verdünnungen von 1:10.000 bis 1:80.000 geprüft. Dies entspricht einer Konzentration von 100 ng/mL bis 12,5 ng/mL.

Durchführung:

- 50 µL Probe + 100 µL Konjugat
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
- 3x waschen mit verdünntem TWP
- 100 µL Substrat (TMB)
- 15 min Inkubation bei Raumtemperatur
- 100 µL Stopp-Lösung
- Messung bei 450 nm/ 630 nm

### 4.2.8.3 Testablauf

Für den Ablauf des Testes wurde ein Ein-Schritt Format gewählt.

Dafür wird der Test wie folgt durchgeführt:

- XX µL verdünnte Probe/ Standard + XX µL Konjugat
- Inkubation bei RT für XX min
- 3x waschen mit verdünnter Waschlösung
- 100 µL Substrat (TMB)
- Inkubation 15 min
- 100 µL Stopplösung
- Messung bei 450 nm/620 nm

Die mit XX versehenen Volumina werden in der Austestung überprüft, wie in 4.2.8.2 beschrieben.

#### 4.2.9 Vorversuche zur Adaptierung auf den DRG:HYBRiD-XL®

Um eine Adaption des manuellen Assays auf den Vollautomaten möglich zu machen, müssen verschiedene Punkte erfüllt werden. Die Inkubation des Assays muss bei 37 °C ablaufen, da dies die vorgegebene Inkubationstemperatur auf dem DRG:HYBRiD-XL ist. Zusätzlich sind aufgrund der festen Zeitpläne, die in der Software des Geräts festgeschrieben sind, nur Inkubationszeiten in 30 min Schritten möglich. Auch ist festgelegt, dass aufgrund einer andern Waschprozedur die Standardeinstellung des Waschens bei 4 Zyklen liegt. Im Vergleich zur Waschprozedur mit dem Waschautomaten, der mit einer Overflowtechnik das Well mit 400 µL durchspült, werden hier 300 µL ins Well gegeben und wieder abgesagt. Für die Anwendung der Ergebnisse der manuellen Vorversuche auf den Vollautomaten, wurde zunächst die Testprozedur festgelegt. Die Inkubationszeiten können nur in 30 min Blöcken gewählt werden. Kleinere Zeitintervalle sind aufgrund des Scheduler der Software, der für die reibungslose Abarbeitung der Proben zuständig ist, nicht möglich. Zuerst wurde der manuelle Assay auf die Temperaturverträglichkeit der Betriebstemperatur des Automaten von 37 °C geprüft. Hierfür wurde die Standardreihe und Serumproben mit dem manuellen Assay bei Raumtemperatur, sowie bei 37 °C gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass immer 200 µL Substrat verwendet werden. Da für die Messung in der Küvette 150 µL.

Tabelle 13: Vergleich der Durchführung des Ceftazidim Assays manuell und auf dem Vollautomaten.

Durchführung manuell	Durchführung DRG:HYBRiD-XL
50 µL Probe + 200µL Konjugat Inkubation 30 min bei RT 3x waschen 100µL Substrat Inkubation 15 min bei RT 100µL Stopp-Lösung Messung bei 450/ 630 nm	50µL Probe + 150µL Konjugat Inkubation 30 min bei 37°C 4x waschen 200µL Substrat Inkubation 30 Min 37°C Messung nach Ablauf der Zeit Messung bei 645 / 450 nm

In der Assay-Abarbeitung des Ceftazidim und Linezolid Assays kann die Vorverdünnung in beiden Fällen im Automaten mit eine Dilution-Cartridge durchgeführt werden. Dafür wird der Verdünnungspuffer aus dem TW1 verwendet. Es ist auch möglich mit der schon vorverdünnten Probe zu arbeiten.

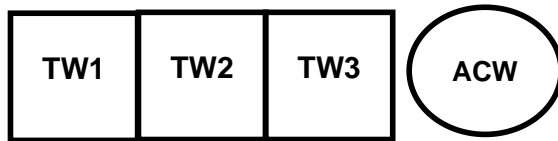
##### Ceftazidim

Im ersten Schritt des Ceftazidim-Assay wird 50 µL der verdünnten Probe in die Nadel aufgenommen. Dann wird aus dem TW2 150 µL Konjugat ebenfalls in die Nadel aufgenommen. Der Inhalt der Nadel wird dann in das ACW pipettiert. Es folgt eine Inkubation von 30 min bei 37 °C Gerätetemperatur. Nach der Inkubation wird das ACW an der Waschstation 4-mal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden 200 µL Substrat aus dem TW3 ins ACW gegeben.



Die Inkubation erfolgt für 30 min, direkt nach Ablauf der Zeit werden 150  $\mu\text{L}$  der Substrat-Lösung in die Küvette transferiert und bei 645 nm/450 nm gemessen.

Die Cartridges des Assays sind wie folgt befüllt:



- TW1: Probenverdünner für automatische Probenverdünnung mit Dilution Cartridge 276  $\mu\text{L}$
- TW2: Enzymkonjugat 260  $\mu\text{L}$
- TW3: Substrat 260  $\mu\text{L}$
- ACW: Antigen-beschichtetes Well (BSA-Ceftazidim)

Im Anschluss wurde ein Testlauf auf dem DRG:HYBRiD-XL® durchgeführt. Das Ablaufschema wurde an den Ablauf des manuellen ELISAs angelehnt.

### Linezolid

Im ersten Schritt des Linezolid-Assay wird 10  $\mu\text{L}$  der verdünnten Probe in die Nadel aufgenommen. Anschließend wird aus dem TW2 100  $\mu\text{L}$  Konjugat ebenfalls in die Nadel aufgenommen und in ACW gegeben. Es folgt eine Inkubation von 60 min bei 37 °C Gerätetemperatur. Mit Ablauf der Inkubationszeit wird das ACW an der Waschstation 4- mal mit Waschpuffer gewaschen. Dann werden 200  $\mu\text{L}$  Substrat aus dem TW3 ins ACW gegeben. Die Inkubation erfolgt für 30 min, direkt im Anschluss werden 150  $\mu\text{L}$  der Substrat-Lösung in die Küvette transferiert und bei 645 nm/450 nm gemessen.

Die Cartridges des Assays sind wie folgt befüllt:

- TW1: Probenverdünner für automatische Probenverdünnung mit Dilution Cartridge 210  $\mu\text{L}$
- TW2: Enzymkonjugat 160  $\mu\text{L}$
- TW3: Substrat 260  $\mu\text{L}$
- ACW: Antigen-Beschichtetes Well (BSA-Linezolid)

Für die ersten Versuche auf dem Hybrid werden Cartridges manuell abgefüllt und verschweißt. Proben wurden für die Vorversuche manuell vorverdünnt. Folglich entfielen die Dilution Cartridges. Da die manuell befüllten Cartridges nicht mit Barcode versehen werden können, wurden alle Testläufe mit Hilfe der Software „Hybrid XL Analytics“ über den Laptop gesteuert. Die Bestimmung der Konzentration aus der optischen Dichte mithilfe der Standardkurve wurde über die 4-Parameter-Regression nach Rodbard, unter Zuhilfenahme des Programms „Assay Fit Pro 1.3“ ausgewertet. In jedem Lauf wurden alle Standardpunkte und Serumproben bestimmt, bei der Auswertung wurden bekannte Konzentrationen mit auf dem Automaten ermittelten Konzentrationen abgeglichen.

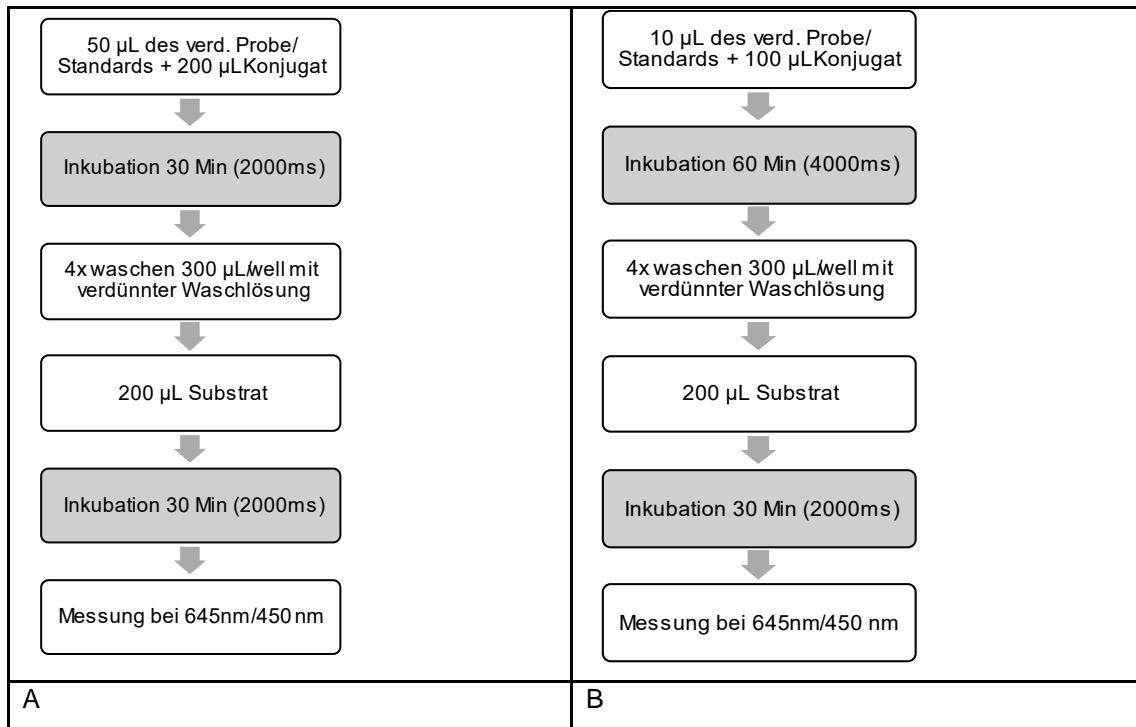


Abbildung 14: Abarbeitung der Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL. (A) Ceftazidim (B) Linezolid.

### 4.2.10 Produktion von Prototypen

Für die technische Dokumentation des Assays ist es nötig, drei Prototypen (Test-Lots) zu produzieren. Für die Vorversuche werden die Cartridges manuell, per Hand abgefüllt und anschließend mit einem Sealer verschweißt. In diesem Fall ist es nicht möglich, mit der Barcode-basierten Software zu arbeiten. Es bedarf des Computerprogramms „Hybrid Analytics“, um diese Cartridges zu nutzen.

Für die Prototypen werden die Cartridges maschinell, mit der Harro Höfliger Maschine, abgefüllt und mit Barcode versehen. Die Cartridges werden vom DRG:HYBRiD-XL erkannt und eigenständig abgearbeitet.

Da Reagenzien in jeder Charge Abweichung aufweisen können, ist es nötig, die Qualität dieser vor Produktion zu testen. Es wird eine Qualitätskontrolle aller Reagenzien sowie der beschichteten Wells durchgeführt.

#### 4.2.10.1 Erstellung der Mastercurve

Um die Masterkurve zu erstellen, wurden die Standardreihe ( $S_0$ –  $S_{max}$ ) und die zwei Kontrollen bzw. Rekalibratoren in zwei Läufen je in einer 5-fach-Bestimmung gemessen. Die ermittelten OD-Werte ( $n=10$  pro Standardpunkt) wurden gemittelt und über AssayFit und der 4-Parameter-Rodbard-Regression eine Standardkurve erstellt und die Konzentrationen für Kontrollen und Rekalibratoren ermittelt. Dabei darf der Variationskoeffizient (VK) der OD-Werte nicht größer als 10 % sein.

#### 4.2.10.2 Qualitätskontrolle der Plattenbeschichtung

Um eine gute Präzision der Probenmessung zu garantieren ist es wichtig, dass die 96-Well Platten gleichmäßig (homogen) mit Antigen beschichtet werden. Daher werden eine 96-Well-Platte aus der Mitte der Produktionscharge auf ihre Beschichtungshomogenität überprüft. Dafür wird in drei aufeinanderfolgenden Läufen die 96-Well Platte, auf demselben Gerät vermessen. Als Probe wurde eine Mischung von Kontrolle 1 und Kontrolle 2 verwendet. Für die Auswertung wird der Mittelwert der OD, so wie der Variationskoeffizient der gesamten Platte bestimmt. Der Variationskoeffizient darf höchstens bei 7,5 % liegen, der Mittelwert der OD sollte zwischen 0,8 und 1,2 OD liegen.

Zusätzlich wird die Messung innerhalb der Produktionscharge der Platten geprüft. Dafür wird die Standardreihe mit den zugehörigen Kontrollen auf der drei Platten der Charge vermessen. Es wird die 1. Platte (Anfang), eine Platte der Mitte der Charge und die letzte Platte (Ende) verwendet.

Als Referenz dient, wenn vorhanden, eine Platte der Vorcharge. Mit diesem Versuch soll sichergestellt werden, dass die Beschichtung in jeder Phase der Produktion der Platten gleich ist.

### 4.2.10.3 Funktionelle Qualitätskontrolle

Die funktionelle Qualitätskontrolle umfasst die Prüfung aller für die Produktion einer neuen Charge verwendeten Komponenten. Dabei werden alle die Qualität der Charge beeinflussenden Materialien, wie Standards und Konjugat aufeinander abgestimmt und geprüft.

Für die Qualitätskontrolle 1 (QC1) werden die frisch hergestellten Assaykomponenten manuell in die Cartridges abgefüllt und versiegelt. Mit diesem Cartridges werden Standards, Kontrollen und Patientenproben oder externe Kontrollen in Doppelbestimmung gemessen. Ausgewertet werden die gemessenen Konzentrationen hinsichtlich der vorgegebenen Zielwerte. Die Abarbeitung dieser Tests erfolgt mit der Hybrid Analytics Software. Stimmen die Zielwerte mit den gemessenen Konzentrationen überein, können die Kitkomponenten zur maschinellen Abfüllung freigegeben werden. Nach der maschinellen Abfüllung wird für die Charge eine Standardkurve, genannt Master Curve (MC) aufgenommen. Diese wird in dem vorläufigen Kit Barcode hinterlegt. Im Anschluss an die Erstellung der Master Curve erfolgte die Qualitätskontrolle 2 (QC2). Dafür wird zum ersten Mal die Rekalibrierung mit der neuen Test-Charge durchgeführt. Anschließend werden die Patientenproben in Doppelbestimmung gemessen.

Liegt die Abweichung von QC1 zu QC2 bei mehr als 20 % so ist ein Korrekturfaktor einzufügen. Durch einen sogenannten Korrekturfaktor kann die Schwankung der Standardkurve mit dem neuen Material angepasst werden.

Wird ein Kit für den Verkauf freigegeben, so erfolgt nach bestandener QC2 die Verpackung des Kits. Dabei kann es zu Erwärmung durch händisches Verpacken oder Lagerung bei Raumtemperatur kommen. Damit der Kunde ein einwandfreies Material erhält, wird nach Verpackung eine weitere Qualitätskontrolle (QC3) durchgeführt. Bei dieser wird erneut rekalibriert und auch die Patientenproben gemessen. Diese Qualitätskontrolle ist für die Entwicklung des Testes nicht nötig.

### 4.2.11 Technische Dokumentation

Sind die Vorversuche zur Testentwicklung abgeschlossen, beginnt die technische Dokumentation. Diese ist in Entwicklungsverifizierung und Validierung gegliedert und dient der Ermittlung der Leistungsparameter nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG. Ein neu entwickelter Test muss diese Versuche zur Verifizierung beziehungsweise Validierung durchlaufen und bestehen, um für den Verkauf freigegeben zu werden. Der Ablauf der Versuche erfolgt nach der *Arbeitsanleitung Entwicklung: Design und Entwicklungsverifizierung* der DRG Instruments GmbH (DRG,2018).

Die Versuche werden nach festgelegten Ablaufschemata mit den maschinell abgefüllten Prototypen und den jeweiligen Masterkurven durchgeführt. Zur Validierung der Läufe wurden immer Kontrolle 1 und Kontrolle 2 mitgeführt und nach vorgegebenen Sollwertbereichen bewertet. Läufe sind nur als gültig zu bewerten, wenn beide Kontrollen im Sollwertbereich gefunden werden.

Alle folgenden Versuche wurden, sofern nicht anders beschrieben, anhand des in der

Abbildung 14 aufgeführten Ablaufschema der automatisierten Testabläufe für Cefprozid und Linezolid durchgeführt. Alle Proben, sofern nicht anders beschrieben, wurden aus Referenzmaterial und Stocklösung mit definierter Konzentration hergestellt.

### 4.2.12 Verifizierung

#### 4.2.12.1 Bestimmung der analytischen Spezifität

Zur Bestimmung der analytischen Spezifität werden strukturell verwandte Substanzen in 4 verschiedenen Konzentrationen gemessen.

#### 4.2.12.2 Bestimmung des Limit of Blank

Die Rauschgrenze einer Probe ohne Analyten, also der Blank, wurde in zwei Läufen mit je 30 Bestimmungen gemessen. Als Probe wurde der Nullstandard verwendet. Aus allen Messungen wurde der Mittelwert, so wie die Standardabweichung berechnet. Mithilfe der folgenden Formel wurde das Limit of blank (LOB) für den kompetitiven ELISA bestimmt:

$$\text{Formel 5} \quad \text{LOB} = OD_{\text{mean}} - 1.645 \times SD$$

Hierbei ist zu beachten, dass die  $OD_{\text{mean}}$  dem Mittelwert der optischen Dichte aller 60 Bestimmungen entspricht. Als SD wird die Standardabweichung der Messung angenommen.

#### 4.2.12.3 Bestimmung der analytischen und funktionellen Sensitivität

Für die Bestimmung der Sensitivität wird eine Probe mit einer Konzentration unterhalb des ersten Standardpunktes (Ceftazidim 25 ng/mL/ Linezolid 50 ng/mL) 1:2 mit dem Probenverdünner verdünnt und in zwei Läufen mit je 30 Bestimmungen auf dem gleichen Gerät gemessen. Die Probe wird verdünnt und erneut gemessen, bis sie einen Variationskoeffizienten von über 20 % aufweist.

Es wird zum einen die analytische Sensitivität, das Limit of Detection (LOD) wie in Formel 6 beschrieben ermittelt. Der LOD beschreibt zudem die Konzentration, an der 95 % aller Messungen über dem LOB gefunden werden.

$$\text{Formel 6} \quad \text{LOD} = \text{LOB} + 1,645 \times SD_{(\text{lowest conc. sample})}$$

Für das Limit of Quantification wird als weiteres Kriterium verlangt, dass die Probe mit einem Variationskoeffizient von <20 % bestimmt werden kann. Das Limit of Quantification stellt die funktionelle Sensitivität dar.

4.2.12.4 Ermittlung der Richtigkeit (Traceability)

Neben der Genauigkeit eines Assays (Präzision) wird auch die Richtigkeit der Messung überprüft. Ziel ist es, die Vergleichbarkeit zu anderen Assays herzustellen und zu prüfen, ob der Test in der Lage ist offizielles Referenzmaterial richtig zu bestimmen.

Die Richtigkeit der Messung wird für die Assay anhand der Eureka-Kit LC79016 Kontrollen bestimmt. Wichtig für diese Messung ist, dass sich die Proben in drei verschiedenen Konzentrationsbereichen befinden. Die drei Referenzproben Level 1-Level 3 werden sechsfach in einem Run vermessen.

Es wird die Präzision, sowie die Wiederfindung zum Zielwert geprüft. Als weiteres Kriterium wird der Bias in % und in ng/mL betrachtet, welcher die Messabweichung beschreibt.

Die gemessenen Konzentrationen der drei Referenzproben des Referenzmaterials dürfen um nicht mehr als 20 % von den erwarteten Konzentrationen abweichen.

4.2.12.5 Präzision

Bei der Bestimmung der Präzision werden drei Aspekte beachtet. Es wird die Within-Run Präzision, die Genauigkeit der Messungen innerhalb eines Laufes, die Between-Run Präzision, die Präzision der Messung desselben Geräts an verschiedenen Tagen, sowie die Between-Device Präzision, welche die Akkuratheit des Testes an verschiedenen Tagen auf unterschiedlichen Geräten beschreibt.

Zum Zeitpunkt der Validierung des Ceftazidim Assays, welche mit März 2021 durchgeführt wurde, war für diese Prüfung die Bestimmung von sechs Proben in fünffacher Bestimmung an fünf unterschiedlichen Tagen auf zwei unterschiedlichen Automaten gefordert.

Die Berechnung der Variationskoeffizienten für jede Probe erfolgte mit Hilfe der folgenden Formeln:

Formel 7 
$$\text{Intra Assay VK (\%)} = \text{Mittelwert (VK}_{\text{Messung 1-5}}) * 100$$

Formel 8 
$$\text{Inter Assay VK (\%)} = \frac{SD_{25 \text{ Bestimmungen}}}{\text{Mittelwert}_{25 \text{ Bestimmungen}}} * 100$$

Für die Auswertung des Intra- und Inter-Assays wurden fünf Messungen mit je 5-facher Bestimmung (n= 25) betrachtet.

Bei der Intra- und Inter-Device Präzision wurden die Messungen beider Geräte zusammengefasst mit je fünf Messungen mit je fünffacher Bestimmung (n=50).

Formel 9 
$$\text{Intra Device VK (\%)} = \text{Mittelwert (VK}_{\text{Messung 1-10}}) * 100$$

Formel 10 
$$\text{Inter Device VK (\%)} = \frac{SD_{50 \text{ Bestimmungen}}}{\text{Mittelwert}_{50 \text{ Bestimmungen}}} * 100$$

Das Protokoll des Versuchs änderte sich allerdings im Vorfeld der Validierung des Linezolid Assays auf dem Hybrid. Zur Vorbereitung auf die Einführung der IVDR (Regulation (EU) 2017/746) wurde dieser Versuch erweitert.

Nach den neuen Vorgaben ist nun eine Bestimmung von sechs Proben in fünffacher Bestimmung an fünf unterschiedlichen Tagen, im Unterschied zu den vorherigen Vorgaben allerdings an drei Geräten durchgeführt werden.

4.2.12.6 Wiederfindung (Recovery)

Zur Ermittlung der Wiederfindung von aufgestockten Proben werden sechs Proben, jeweils in Doppelbestimmung, in verschiedenen Konzentrationen gemessen. Für die Aufstockung der Proben werden vier verschiedene Spiking Lösungen hergestellt. Für die Herstellung dieser werden Standard 4 ( $S_{max-1}$ ) und Standard 5 ( $S_{max}$ ) in verschiedenen Verhältnissen (Tabelle 14) gemischt. Die sechs Patientenproben werden 1:10 mit diesen Aufstock-Lösungen und einem Puffer ohne Analyten verdünnt.

Tabelle 14: Beispiel zur Herstellung der Aufstocklösungen A-D.

		Beispiel: Herstellung von 1000µL Aufstock-Lösung		
		$S_{max}$ (µL)	$S_{max-1}$ (µL)	Gesamtvolumen (µL)
Lösung A:	$S_{max}$	1000	-	1000
Lösung B:	90% $S_{max}$ +10% $S_{max-1}$ )	900	100	1000
Lösung C:	60% $S_{max}$ +40% $S_{max-1}$ )	600	400	1000
Lösung D:	40% $S_{max}$ +60% $S_{max-1}$ )	400	600	1000

Für die Wiederfindung der Proben wird zunächst jede Patientenprobe 1 zu 10 mit den auf Stock Lösungen verdünnt. Anschließend wurden die Lösungen A bis D, sowie die aufgestockten Patientenproben auf dem DRG:HYBRiD-XL vermessen.

Die Wiederfindung für jede Probe wird wie folgt berechnet (Formel 11), hierbei ist zu beachten, dass sich die erwartete Konzentration aus der Summe der Konzentration der Probe und des zugegebenen Analyten ergibt. Die Konzentration der aufgestockten Probe sollte mit einer Abweichung von +/- 20 % vom erwarteten Zielwert gemessen werden.

Formel 11

$$\begin{aligned}
 & \text{Wiederfindung(\%)} \\
 & = \frac{\text{gemessene Konzentration}}{\text{erwartete Konzentration}} * 100
 \end{aligned}$$

Tabelle 15: Beispiel zur Durchführung des Versuchs zur Wiederfindung mit Ermittlung der Wiederfindung (%)

Konzentration Probe (ng/mL)	Konzentration (zugegeben) (ng/mL) [Konz. der Lösungen A-D (1:10)]	Gemessene Konzentration der aufgestockten Probe (ng/mL)	Erwartete Konzentration (ng/mL) [Konzentration Probe+ Konzentration der Lösungen A-D (1:10)]	Wiederfindung (%) [Zulässig zwischen 80-120 %]
100	0	99	100	
	100	190	200	95
	70	165	170	97
	50	140	150	93
	30	120	130	92

4.2.12.7 Linearität

Des Weiteren ist die Linearität der Verdünnung von Proben zu bestimmen. Dabei werden vier Proben in Doppelbestimmung unverdünnt, sowie 1 zu 2,1 zu 4,1 zu 8,1 zu 16, mit Verdünnungspuffer verdünnt gemessen. Eine fünfte Probe, deren Konzentration ungefähr 20-fach des  $S_{max}$  ist, wird so lange 1:2 verdünnt, bis sie den LOD erreicht. Um auch kleiner Verdünnungen zu gewährleisten wird eine sechste Probe unverdünnt, sowie 1:1,25, 1:1,5, 1:1,75 und 1:2 gemessen.

Da die Tests einer Vorverdünnung bedürfen, werden diese Proben im Rahmen Testvorbereitung regulär 1:100 und 1:10 vor verdünnt.

Die Linearität der Verdünnung wird wie folgt berechnet, wobei für die erwartete Konzentration der gemessenen Probe, die Konzentration der unverdünnten Probe dividiert durch die jeweilige Verdünnung angenommen wird.

Formel 12 
$$Linearität(\%) = \frac{\text{gemessene Konzentration}}{\text{erwartete Konzentration}} * 100$$

4.2.12.8 Matrix-Interferenz

In Blutproben können immer wieder Substanzen wie Hämoglobin, Bilirubin und Triglyceride vorkommen, deshalb muss geprüft werden, ob der Test eine Interferenz zu diesen Substanzen aufweist. Dazu wurden als Stock Lösungen Verdünnungsreihen der Substanzen hergestellt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Verdünnungsreihen der Substanzen für den Versuch Matrix Interferenz. Angegeben sind Konzentration der Stocklösung (fett), sowie die Konzentration der mit PBS verdünnten Lösungen(kursiv) in mg/mL.

Verdünnungsmedium PBS		
Stocklösung Hämoglobin (400 mg/mL)	Stocklösung Bilirubin (50 mg/mL)	Stocklösung Triglyceride (750 mg/mL)



40 mg/mL	5 mg/mL	75 mg/mL
20 mg/mL	2,5 mg/mL	37,5 mg/mL
10 mg/mL	1,25 mg/mL	18,75 mg/mL
5 mg/mL	0,625 mg/mL	4,69 mg/mL

Anschließend wurden Proben 1:10 mit der jeweiligen verdünnten Testsubstanz versetzt und auf dem Hybrid XL vermessen. Als Referenz dient hierbei die jeweilige Probe die 1:10 mit PBS, welches als Verdünnungsmedium zur Herstellung der Testsubstanz verwendet wurde, verdünnt wurde. Zur Beurteilung der Matrix Interferenz ist die Abweichung der Probenkonzentration nach Zugabe der interferierenden Substanz bis maximal 20% zulässig.

### 4.2.12.9 Bestimmung des Probentyps (Sample Collection)

Die Blutentnahme bei Patienten kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. Ziel dieses Versuches ist es die Interferenzen, die von der Art der Probenentnahme ausgehen können zu prüfen. Dafür werden die Patientenproben parallel mit verschiedenen Entnahmemethoden vorbereitet und die Messwerte verglichen. Bei Serum als Matrix werden die Werte mit Plasma als alternativer Entnahmemethode verglichen. Bei den Probentypen handelte es sich um Serum, sowie Heparin-Plasma, EDTA-Plasma und Citrat-Plasma. Anschließend wurde zur Bewertung die Wiederfindung der Plasmaproben ermittelt, indem Serum als Referenzwert verwendet wurde. Bei einer Wiederfindung von  $(100 \pm 20) \%$  können die alternativen Methoden zur Probenentnahme verwendet werden.

### 4.2.12.10 Stabilitätsprüfung

#### 4.2.12.10.1 Stabilitätsprüfung einzelner Komponenten

Im Rahmen der Vorversuche wird die Stabilität der Einzelkomponenten geprüft. In diesem Stadium der Entwicklung ist es noch möglich die Reagenzien einzeln zu betrachten um Stabilitätsprobleme, die von einem Reagenz ausgehen ausfindig zu machen. Die Einzelkomponenten werden bei 2-8 °C (4 °C) gelagert und parallel dazu bei 40 °C gestresst. Die Messung der Reagenzien erfolgt dann parallel. Es sollte keine Abweichung die 20 % überschreitet festgestellt werden.

#### 4.2.12.10.2 Stabilitätstest der Kontrollen und Rekalibratoren

Um den Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Kontrollen und Rekalibratoren zu ermitteln, wurden diese sowohl bei 2-8 °C (4 °C, nach Gebrauchsanweisung), als auch bei 40 °C gelagert. Diese wurden jeweils in Doppelbestimmung nach Tag 1, 2, 3, 4 und 7 gemessen. Die Abarbeitung des Assays erfolgt nach Gebrauchsanweisung. Als Referenzwert galten die am Tag 0 gemessenen Werte der Rekalibratoren, die bei 2-8 °C gelagert wurden. Eine Abweichung von  $\pm 20 \%$  ist erlaubt.

Für die lyophilisierten Kontrollen und Rekalibratoren des Ceftazidim Assays ist es außerdem nötig die Haltbarkeit nach Rekonstitution des Lyophilisats zu prüfen.

Die Messung der rekonstituierten Kontrollen erfolgt nach dem Auflösen an vier aufeinanderfolgenden Tagen. Die Lagerung der Reagenzien erfolgt dabei bei 4 °C. Hier wird auch das Akzeptanzkriterium von  $\pm 20 \%$  angewandt.

#### 4.2.12.10.3 Stabilitätstest der Cartridges bei 40 °C

Bei diesem Versuch wurde der Einfluss der Lagerungstemperaturen auf die Cartridges untersucht. Dabei wurden mehrere Blister bei 40 °C gelagert. An Tag 0 wurden die Referenzwerte von sechs Proben und zwei Kontrollen gemessen.

Schließlich wurden nach Tag 1, 2, 3, 4 und 7 mit den bei 40 °C gelagerten Cartridges die Proben und Kontrollen in Doppelbestimmung vermessen und mit den Referenzwerten verglichen. Die

Abarbeitung des Assays erfolgt nach Gebrauchsanweisung. Eine Abweichung von  $\pm 20\%$  ist erlaubt. Sobald eine größere Abweichung zu erkennen war, wurde eine Rekalibration mit den bei  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Cartridges durchgeführt. Nach dieser Rekalibration sollten die Proben wieder mit einer maximalen Abweichung von  $20\%$  zu finden sein.

#### 4.2.12.10.4 Stabilitätstest des gesamten Kits bei Raumtemperatur

Auch der Einfluss der Lagerung bei Raumtemperatur (RT,  $20\text{-}24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) auf das Kit wurde untersucht. Das Kit wurde bei RT gelagert und nach Tag 1, 7, 14 und 21 wurden sechs Proben und Kontrollen vermessen. Verglichen wurde mit bei  $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagertem Kit. Die Abarbeitung des Assays erfolgt nach Gebrauchsanweisung. Eine Abweichung von  $\pm 20\%$  ist erlaubt. Sobald eine größere Abweichung zu erkennen war, wurde eine Rekalibration mit den bei RT gelagerten Cartridges durchgeführt. Nach dieser Rekalibration sollten die Proben wieder mit einer maximalen Abweichung von  $20\%$  zu finden sein.

#### 4.2.12.10.5 On-Board- Stabilität Carry-Over

Die On-Board Stabilität wurde durch Messung der Kontrollen und Rekalibratoren bestimmt. Dafür wurde ein Gerät vorab rekaliert und die Kontrollen und Rekalibratoren zum Zeitpunkt 0 gemessen. Die Originalflaschen der Kontrollen und Rekalibratoren wurden offen im DRG:HYBRiD-XL® stehen gelassen und nach 4, 8, 24 und 48 h erneut gemessen. Die zu den unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Konzentrationen wurde bezüglich der Wiederfindung ( $\pm 15\%$ ) beurteilt.

#### 4.2.12.10.6 Stabilität nach Transportsimulation

Im Allgemeinen werden die Kits für den DRG:HYBRiD-XL gekühlt versendet.

Für den Fall, dass diese Kühlung nicht aufrechterhalten werden kann, wird der Transport simuliert.

Für diesen Versuch werden jeweils zwei Kits der Transportsimulation unterzogen und zwei Kits wie vom Hersteller empfohlen bei  $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Wie in Abbildung 15 gezeigt ist werden die 2 Kits aus dem Kühlschrank zu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  gestellt und dort für 8 h gelagert, dies kann zum Beispiel den aus dem Kühlhaus in einem Transporter zum Flughafen simulieren. Über Nacht werden die Kits wieder bei  $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Am kommenden Tag werden die Kits für 8 h bei Raumtemperatur gelagert. Dies kann zum Beispiel beim Sortieren oder Vorbereiten auf eine Lieferung passieren. Anschließend werden die Kits für 2 Tage im Kühlhaus gelagert bevor sie weitere 8 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  gestresst werden. Nach der Lagerung der Kits bei  $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht erfolgt am darauffolgenden Tag die Messung. Es werden sechs Proben und zwei Kontrollen gemessen. Als Referenz wird das im Kühlschrank gelagerte Kit verwendet. Das verbleibende gestresste Kit wird für die Messung nach 12 Monaten im Kühlschrank gelagert und dann erneut gemessen.

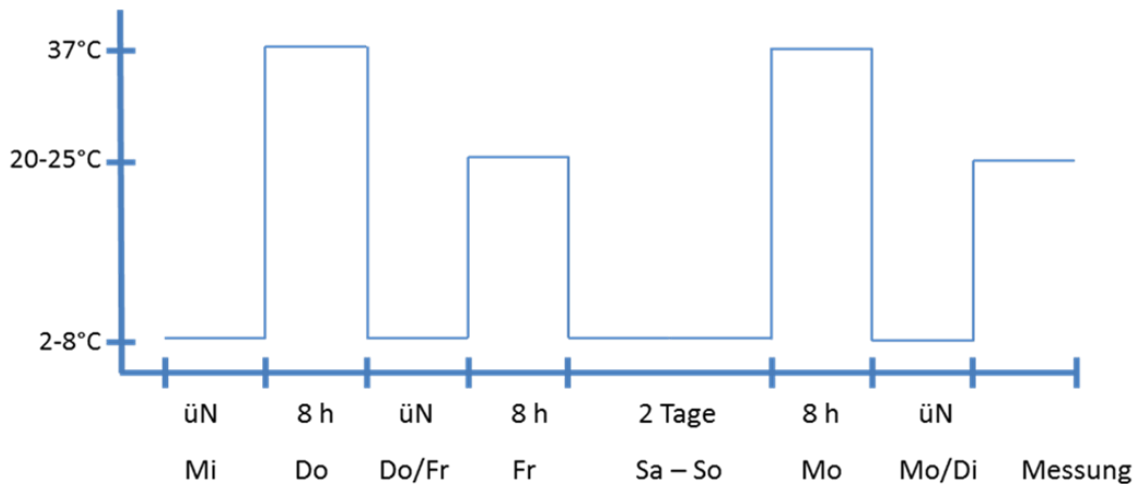


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Lagerungsbedingungen eines Kits bei der Prüfung der Transportstabilität.

## 4.2.13 Validierung

### 4.2.13.1 Bestimmung von Referenzwerten mit Proben gesunder Individuen

Zur Bestimmung der Werte, die für gesunde, sich nicht in Behandlung mit dem Antibiotikum befindlichen Personen wurden 70 Proben von Frauen und Männern gemessen.

Es wurde die 5, 95, 97,5 und 99 % Perzentile sowie der Mittelwert, Median und die Standardabweichung bestimmt.

Die Auswertung diente der Ermittlung des Hintergrunds, der schon von gesunden Individuen ausgehen kann.

### 4.2.13.2 Methodenvergleich

Die Prüfung der Vergleichbarkeit mit anderen Methoden ist wichtig, um die Validität des Assays sicherzustellen.

Als Referenzmethode wird eine im Markt etablierte Methode verwendet. Im Fall der Assays Linezolid und Ceftazidim wird ein Vergleich mit der Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) gewählt, da diese Methode den Goldstandard zur Messung der Antibiotika darstellt.

Patientenproben (min. 20) deren Konzentration über den Messbereich verteilt ist. Sehr hoch konzentrierte Proben müssen verdünnt werden.

Die internen Kontrollen und Proben werden mit dem DRG:HYBRiD-XL und der ausgewählten Referenzmethode parallel in Einzelbestimmung gemessen (Doppelbestimmung, wenn möglich).

Die Messungen sollten zeitnah durchgeführt werden (ideal parallel), um die Verluste durch Einfrieren-Auftauen vermeiden (eventuell Aliquots). Die Methoden werden nach IFU abgearbeitet.

Die erhaltenen Werte werden in eine EXCEL-Tabelle übertragen und grafisch ausgewertet. Der Korrelationskoeffizient, die Steigung der Geraden und der Schnittpunkt mit der Y-Achse für DRG:HYBRiD-XL und die Referenzmethode werden mit dem Analyse-Tool Analyse-it berechnet. Der Korrelationskoeffizient, für DRG:HYBRiD-XL und die Referenzmethode soll  $\geq 0,75$  sein.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Antigen Design

*Diese Information wurde auf Grund von Firmengeheimnissen nicht veröffentlicht.*

### 5.2 Immunisierung

Die hergestellten Konjugaten wurden für die Immunisierung von zwei Mäusen und zwei Ratten verwendet. Dabei wurde jeweils wie in 4.2.3 beschrieben eine Mischung der BSA-Linezolid und BSA-Ceftazidim Konjugate den Tieren verabreicht.

Gleiches wurde mit den KLH-Konjugaten durchgeführt. Nach der Immunisierung wurde nach 30 Tagen den Tieren eine erste Blutprobe entnommen. Die Immunisierung der Ratten mit beiden Carrierproteinen zeigte deutlich weniger Signal als die der Mäuse (Abbildung 16). Die mit KLH-Antibiotika Konjugaten immunisierten Ratten zeigten eine niedrige Reaktion auf das zum Screening als Negativkontrolle verwendete BSA. Es waren niedrige Signale auf dem BSA-Ceftazidim nachweisbar. Das Signal auf dem BSA-Linezolid war bis zu einer Verdünnung von 1:4000 nachweisbar. Bei der mit den BSA-Antibiotika immunisierten Ratte zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Negativkontrolle des Carrierproteins, in diesem Fall KLH zeigte niedrige Signale. Auch hier waren nur sehr geringe Signale auf dem Ceftazidim-KLH nachweisbar. Diese blieben in allen Verdünnungsschritten unter 0,2 OD. Die Immunisierung mit dem Linezolid-Konjugat scheint auch in diesem Fall besser funktioniert zu haben. Die nachgewiesenen Signale der 1:500 Verdünnung des Serums zeigten eine OD von 0,66.

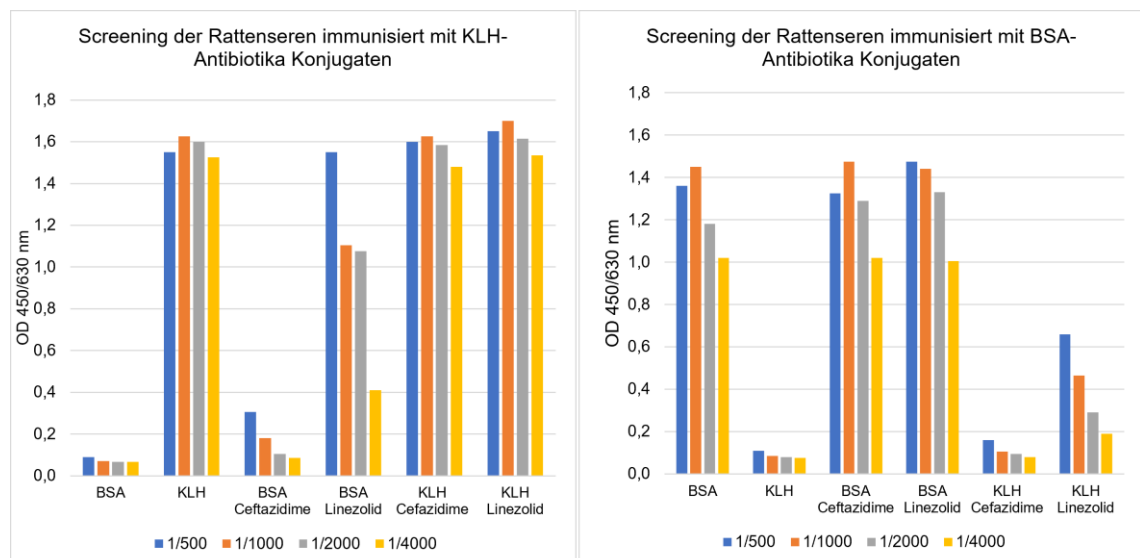


Abbildung 16: Screening der Immunsereen immunisiert mit BSA und KLH-Antibiotika Konjugaten.

Die Vermessung der Seren der Mäuse zeigte, dass die mit den KLH-Konjugaten immunisierten Mäuse deutlich besser auf beide Antibiotika reagierten. Die mit BSA-Konjugaten immunisierten Tiere zeigten nur für Linezolid einen Titer bis zu einer Verdünnung von 1:2000 (Maus1-BSA-

Linezolid) und 1:6400 (Maus2BSA-Linezolid) (Tabelle 17). Gegen Ceftazidim waren keine ausreichenden Antikörper-Titer nachweisbar. Die mit KLH immunisierten Mäuse zeigten für beide Antibiotika eine Immunreaktion. Die Maus1-KLH ist zudem die Einzige, die im Screening auf beide Antibiotika eine Reaktion zeigte.

Tabelle 17: Auswertung der Verdünnungsreihen des Serums des first bleeds der mit den Carrierprotein-Antibiotika Konjugaten immunisierten Mäuse. Als Testantigen wurde für die BSA-Antibiotika immunisierten Mäuse ein KLH-Antibiotika Konjugat verwendet für die KLH-Antibiotika ein BSA-Konjugat. Die Verdünnung wurde von 1:500 bis 1:6400 durchgeführt. Die OD wurde bei 450 nm gemessen.

Mäuse BSA- Antibiotika				
Immun. Antigen	Maus 1- BSA-Ceftazidim	Maus 1- BSA-Linezolid	Maus 2- BSA-Ceftazidim	Maus 2- BSA-Linezolid
Screening Antigen	KLH-Ceftazidim	KLH-Linezolid	KLH-Ceftazidim	KLH-Linezolid
Verdünnung 1:	OD 450 nm			
500	0,520	1,990	0,370	1,200
1000	0,380	1,750	0,280	1,200
2000	0,280	1,340	0,230	1,150
4000	0,200	0,960	0,150	1,170
1600	0,160	0,590	0,120	1,200
3200	0,130	0,420	0,100	1,200
6400	0,110	0,260	0,090	1,180
blank	0,090	0,100	0,080	0,084

Mäuse KLH- Antibiotika				
Immun. Antigen	Maus1-KLH Ceftazidim	Maus1-KLH Linezolid	Maus2-KLH Ceftazidim	Maus2-KLH- Linezolid
Screening Antigen	BSA-Ceftazidim	BSA-Linezolid	BSA-Ceftazidim	BSA-Linezolid
Verdünnung 1:	OD 450 nm			
500	1,180	1,160	0,460	1,220
1000	0,810	1,150	0,256	1,220
2000	0,530	1,110	0,170	1,250
4000	0,300	1,200	0,135	1,330
1600	0,200	1,150	0,110	1,210
3200	0,127	0,940	0,080	1,000

6400	0,114	0,640	0,085	0,630
blank	0,087	0,100	0,070	0,070

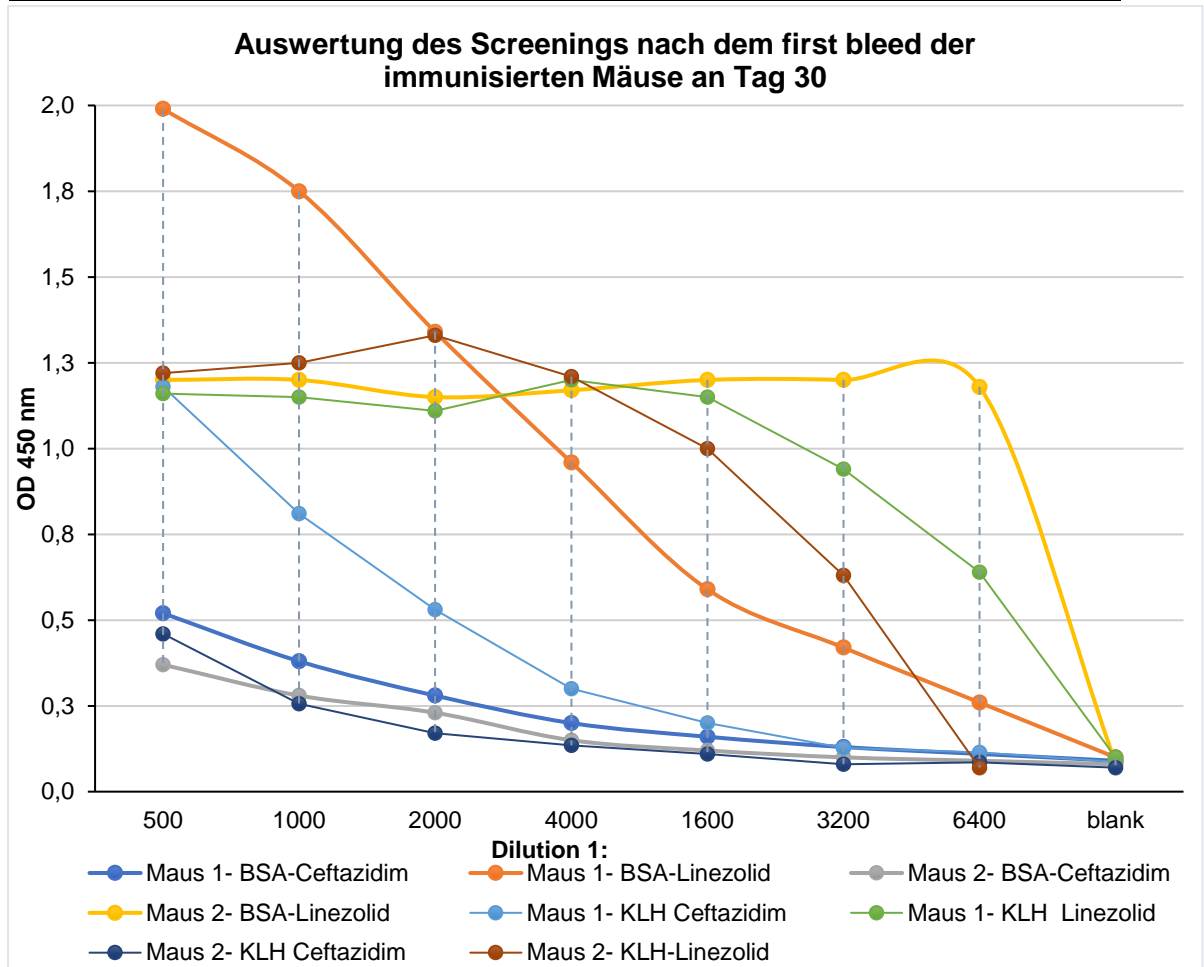


Abbildung 17: Auswertung des Screenings der Mäuse an Tag 30.

Nach einer weiteren Booster Injektion für die Maus2-KLH mit KLH-Linezolid und die Maus1-BSA mit beiden Antibiotika Konjugaten zeigte sich ein weiterer Anstieg der Titer vor der Entnahme der Milzzellen.

In dem Screening vor der Fusion wurde nochmal der Titer gegen Ceftazidim geprüft. Dabei zeigte sich, dass die Maus1KLH durch die erneute Boosterinjektion deutlich an Antikörpern gegen das Ceftazidim gewonnen hat.

Im ersten Screening war bei einer Verdünnung von 1:500 lediglich eine OD von 1,18 nachweisbar. Nun zeigt sich bei dem Screening auf dem BSA-Ceftazidim ein Signal von 1,85 OD. Bei dieser Verdünnung ist das pure BSA mit einer OD von 1,85 nachweisbar.

Somit hat der Booster eine Steigerung der Antikörperproduktion im Tier bewirkt. Die Messung zeigt nun 56 % mehr OD als bei der 1. Messung an Tag 30.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Mäuse besser immunisiert wurden als die Ratten. Zusätzlich fällt auf, dass alle Tiere besser auf die Linezolid- Konjugate reagierten als auf die Ceftazidim Konjugate.

Das könnte zum einen daran liegen, dass die Konjugation generell besser war, oder, dass die Ceftazidim Konjugate teilweise nicht mehr intakt waren.

In späteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Ceftazidim, wenn es in Flüssigkeit gelagert wird, nicht lange stabil ist.

### 5.3 Fusion

Nachdem im ELISA bestätigt werden konnte, dass Maus2-BSA Antikörper gegen Linezolid produziert hat und die Maus1-KLH Antikörper gegen die Antibiotika Linezolid und Ceftazidim entwickelt hat, wurde wie in 3.7 beschrieben, das Hybridom hergestellt. Da die Maus1-KLH noch eine weitere Booster Injektion erhalten sollte, wurde zuerst die Fusion der Maus2-BSA durchgeführt.

Der Maus2-BSA konnten  $82 \times 10^6$  Splenozyten entnommen werden, die dann mit den Myelomzellen fusioniert wurden. Das Screening der Hybridomüberstände zeigte allerdings, dass von den 1947 Hybridomas nur 98 positiv auf das KLH-Linezolid reagierten. Die Konkurrenz mit freiem Linezolid Antibiotikum war nur bei einem Klon möglich. Die Milzentnahme der Maus 1-KLH ergab  $90 \times 10^6$  Splenozyten, die für die Fusion genutzt werden konnten. Insgesamt konnten so 2000 Hybridomas hergestellt werden. Da zuvor Antikörper gegen beide Antibiotika in den Seren dieser Maus festgestellt werden konnten, wurde ein Screening für diese durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass etwa 7,5 % der hergestellten Hybridom-Überstände eine Reaktion auf BSA-Linezolid zeigten. Etwa 1,25 % der Klone zeigten auch eine Bindung an freies Linezolid. Dies entspricht 25 Klonen, die freies Linezolid in der Konkurrenz erkennen.

Des Weiteren konnten 3,5 % der Klone BSA-Ceftazidim detektieren und 0,9 % auch das freie Ceftazidim in einem Konkurrenzversuch nachweisen. Dies entspricht 18 Klonen.

#### 5.3.1 Screening der Klone

Das Screening wird in zwei Stufen durchgeführt. Im ersten Screening wird die Bindung an ein an eine Mikrotiterplatte gebundenes Antibiotikum untersucht. Klone, die im ersten Screening eine OD  $>1$  bei einer Messung bei 450 nm zeigen werden im zweiten Screening näher betrachtet.

Im zweiten Screening wird die Reaktion auf eine zusätzliche Konkurrenz auf das freie Antibiotikum in Lösung untersucht.

##### 5.3.1.1 Screening der Klone für Ceftazidim

Im ersten Screening konnten von ursprünglich 18 anti-Ceftazidim positiven Klonen 16 getestet werden. Zwei Klone haben ihr Wachstum eingestellt und können nicht untersucht werden.

Von den getesteten 16 Klonen zeigten 3 nur sehr wenig Signal. Da die Signale dieser Klone OD  $<1$  zeigten, wurden sie nicht weiter betrachtet. Besonders starke Signale auch bei höherer Verdünnung zeigten die Klone 28, 29, 30, 31, 35, 38, 40 und 42 (Tabelle 18a). In Vorbereitung auf das 2. Screening wird eine Verdünnung der Klone festgelegt, die in etwa OD 3 bei 450 nm



ergibt (Tabelle 18b). Das Protokoll des Testablaufs ändert sich für das 2. Screening, da nun der Kompetitor dem System hinzugefügt wird.

Somit wird das die Antikörperkonzentration im Assay 1:2 verdünnt und die Hälfte der OD ist zu erwarten.

Tabelle 18: a) 1. Screening der Klone in Verdünnungsreihen bis zu 1:1600 auf Ceftazidim-BSA (1µg/mL) beschichteten Platten. Blaue Farbe verdeutlicht die Stärke des gefundenen Signals. b) eingesetzte Verdünnung für das 2. Screening der Klone.

	KLON ID	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	38	39	40	41	42	43
a)	Verdünnung																
	pur	1,190	3,746	3,830	3,876	3,835	3,843	3,753	1,549	0,228	3,698	3,851	0,188	3,858	0,790	3,791	3,832
	1:25	0,123	1,235	3,436	3,851	3,628	3,856	1,505	0,178	0,062	3,867	3,768	0,028	3,869	0,959	3,809	1,553
	1:50	0,080	0,755	2,733	3,814	2,777	3,813	0,948	0,118	0,056	3,730	3,602	0,024	3,818	0,703	3,731	0,950
	1:100	0,065	0,393	1,920	3,800	2,352	3,348	0,581	0,078	0,059	3,392	3,081	0,029	3,854	0,459	3,622	0,527
	1:200	0,049	0,250	1,208	3,652	1,508	3,240	0,306	0,046	0,044	2,584	2,316	0,019	3,681	0,282	2,964	0,298
	1:400	0,043	0,144	0,686	2,975	0,884	2,582	0,181	0,035	0,046	1,755	1,552	0,019	3,151	0,167	2,124	0,155
	1:800	0,024	0,076	0,388	2,104	0,525	1,346	0,066	0,022	0,028	1,095	0,874	0,012	2,179	0,092	1,322	0,076
	1:1600	0,012	0,046	0,199	1,176	0,262	0,618	0,031	0,020	0,021	0,625	0,453	0,010	1,397	0,063	0,733	0,043
b)	eingesetzte Verdünnung für das 2. Screening (OD 3)	-	1:10	1:35	1:300	1:35	1:200	1:10	-	-	1:150	1:100	-	1:400	-	1:150	1:10

Bei Konzentrationen von 0-1000 ng/mL zeigen alle eingesetzten Klone eine Verminderung des Signals durch die Kompetition.

Die Klone werden in drei Kategorien aufgeteilt. Dafür wird der Quotient aus der OD S1 und S0 gebildet. Dieser gibt Aufschluss über die Sensitivität des Antikörpers. Fällt bei der Zugabe des Kompetitors, dem freien Antibiotikum, die OD stark ab, so wird viel Antikörper weggebunden. Dies spricht für eine hohe Sensitivität und auch Spezifität des Antikörpers. Um einen möglichst sensitiven Test zu haben, der auch niedrige Konzentrationen des Antibiotikums nachweisen kann, ist es wichtig, dies zu beachten.

Die erste Kategorie beinhaltet die Klone, deren Reaktion auf das freie Antibiotikum nicht stark ist und die somit eine geringe Sensitivität aufweisen. Diese zeigen einen Quotienten der OD S1/ S0 von <80 % des maximal gemessenen OD (S0).

Die zweite Kategorie schließt all die Klone ein, die einen Quotienten der OD S1/S0 von 50 bis 80 %. Diese Klone sind sensitiv, können aber auch noch hohe Antibiotika Konzentrationen wahrnehmen. Die letzte Kategorie umfasst die Klone, deren Quotient der OD S1/ S0 <50 % ist. Diese Klone sind sehr sensitiv und können hohe Konzentrationen nur noch schlecht wiedergeben (

Abbildung 18).

Zum Beispiel zeigt der Klon 32 eine sehr flache Kurve. Es gibt sehr wenig Differenzierung zwischen den verschiedenen Standardpunkten. Eine Messung mit diesem Klon ist beinahe unmöglich, da minimale Unterschiede in der OD einen großen Unterschied in der ermittelten Konzentration mit sich führen. Der Klon 29, welcher einen Quotient S1/S0 von 50 bis 80 % zeigt, hat gerade im niedrigen Konzentrationsbereich eine große Differenzierung. So haben

Schwankungen der Messung nur einen kleinen Einfluss auf die ausgegebene Konzentration. Betrachtet man den Klon 27, so wird deutlich, dass hier die Differenzierung sehr extrem wird. Bei einer maximalen OD von 1,4 reduziert sich die OD bei der Zugabe des freien Ceftazidim auf < 0,5. Dieser Klon wäre gut geeignet, um einen sehr sensitiven Test zu etablieren. Hat aber dann in den höheren Konzentrationsbereichen keine gute Differenzierung mehr.

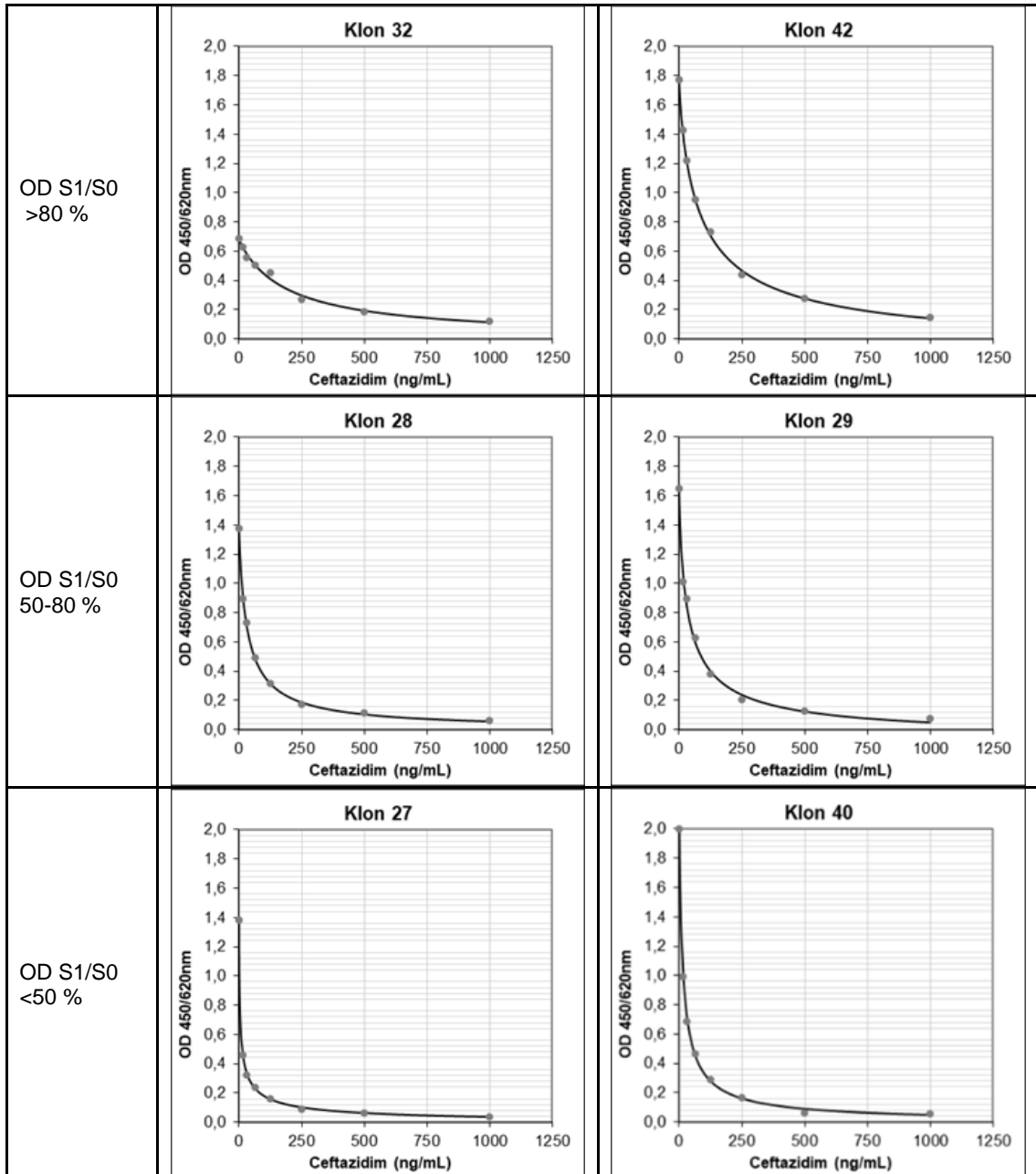


Abbildung 18: Konkurrenzkurven am Beispiel der verschiedenen Klone für Cefprozid aufgeteilt in drei Kategorien. Dargestellt ist die OD bei 450 nm/630 nm bei einer zunehmenden Konzentration von Cefprozid von 0-1000 ng/mL.

Um eine Aussage über die Richtigkeit der Probenmessung mit dem jeweiligen Klon treffen zu können, wird die Konzentration eines Referenzmaterials, das zur Kalibrierung der massenspektrometrischen Messmethode verwendet wird, quantitativ erfasst.

Um dieses Material verwenden zu können, wird es 1:100 in PBS vorverdünnt, da die Konzentrationen in µg/ml nicht gemessen werden können.

Die Klone 27, 32 und 43 konnten nicht weiter betrachtet werden, da die Kulturen das Wachstum eingestellt haben.

Es fällt auf, dass der Klon 42, welcher auch im Vorversuch eine flache Kurve zeigte, anders auf das Referenzmaterial auf Plasmabasis reagiert als auf den im Test verwendeten Standard mit freiem Cefprozid. Bis zu einer Konzentration von 20 ng/mL ist die Kurve noch annähernd gleich, wenn auch etwas steiler als die des Standards. Die Messung von höheren Proben zeigt aber eine deutlich stärkere Abweichung zur Kurve aus dem freien Cefprozid.

Betrachtet man den Klon 29, welcher in der Kategorie von 50 bis 80 % S<sub>0</sub>/S<sub>1</sub> eingeordnet wurde, so sieht man, dass auch hier eine Trennung der beiden zuvor gut übereinstimmenden Kurven ab einer Konzentration von etwa 60 ng/mL erfolgt. Die Kurve nähert sich allerdings in den hohen Konzentrationsbereichen, ab einer Konzentration von 250 ng/mL, wieder an.

Bei den Kurven der verschiedenen Materialien mit der Klon 40 fällt auf, dass die Kurven nie ganz übereinstimmen, aber der Abstand der Kurve des Referenzmaterials und des freien Cefprozid gleich bleibt. Die Korrelation der Kurven der beiden Materialien ist gleichbleibend.

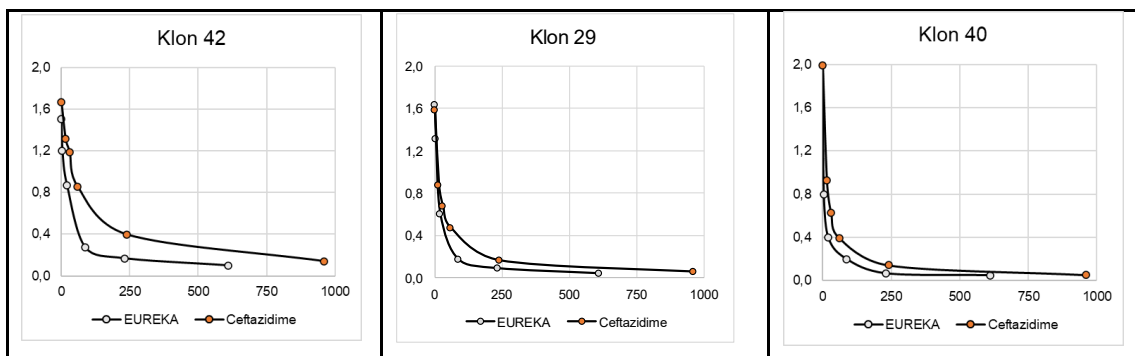


Abbildung 19: Konkurrenzkurven verschiedener Klone bei Messung von plasmabasiertem Referenzmaterial (EUREKA) und Standardmaterial in Standardmatrix.

Abschließend ist zu sagen, dass Klone, die einen Quotienten von S<sub>0</sub>/ S<sub>1</sub> kleiner 50 % aufweisen (

Abbildung 19) gut für die Messung des Cefprozid in Proben eingesetzt werden können. Auch Klone, bei denen die OD von S<sub>1</sub> zu S<sub>0</sub> einen Quotienten von 50 bis 80 % ergibt, können zur Probenmessung verwendet werden, wenn kleine Korrekturen an der Standardkurve vorgenommen werden. Die Klone, bei denen die optische Dichte von S<sub>1</sub> noch mehr als 80 % der

maximalen OD (S<sub>0</sub>) beträgt, sind für die Messung des Referenzmaterials nicht geeignet, da eine zu große Abweichung der Kurven voneinander sichtbar wird.

Für die Entwicklung des Cefprozid Assays wurden die Klone 29 und 40 ausgewählt. Aus diesen wurden Antikörper hergestellt, die im weiteren Verlauf getestet werden.

### 5.3.1.2 Screening der Klone für Linezolid

Im ersten Screening wurden 25 anti-Linezolid positive Klone gefunden.

Von den getesteten 25 Klonen zeigten 12 nur wenig Signal. Da für weitere Tests eine höhere OD benötigt wird, wurden die Klone 2, 3, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 22, 23, 24 nicht weiter untersucht.

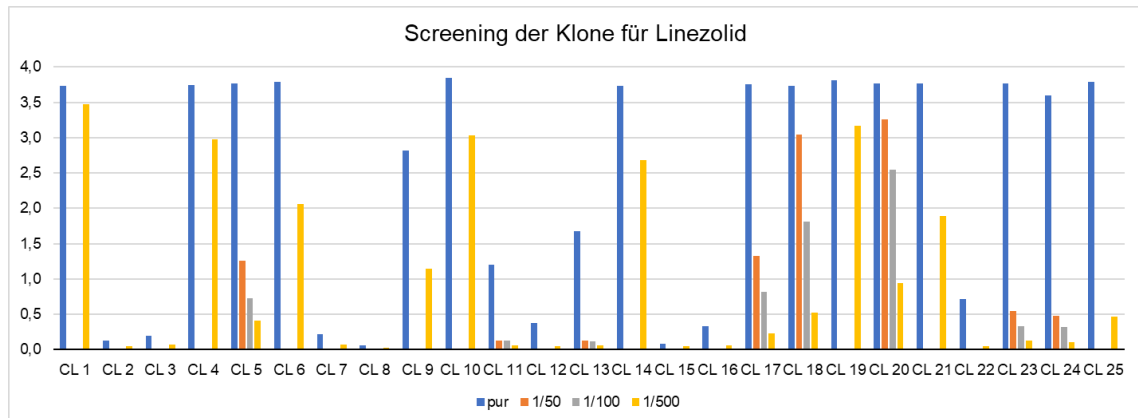


Abbildung 20: Screening der Klone in Verdünnungsreihen bis zu 1:500 auf Linezolid-BSA (1µg/mL) beschichteten Platten.

Besonders starke Signale auch bei höherer Verdünnung zeigten die Klone 1, 4, 6, 10, 14, 19 und 21 (Abbildung 20).

In Vorbereitung auf das 2. Screening wurde eine Verdünnung der Klone festgelegt, die in etwa 3 OD bei 450 nm ergibt. Im weiteren Verlauf des Screenings konnte auch hier die Fähigkeit zu Kompetition der Klone bewertet werden. Es wurden wieder, wie beim Screening des Cefprozids, drei Kurvenspezifikationen unterschieden (Tabelle 19). Die Definitionen der Kategorien sind unter 5.3.1.1 nachzulesen.

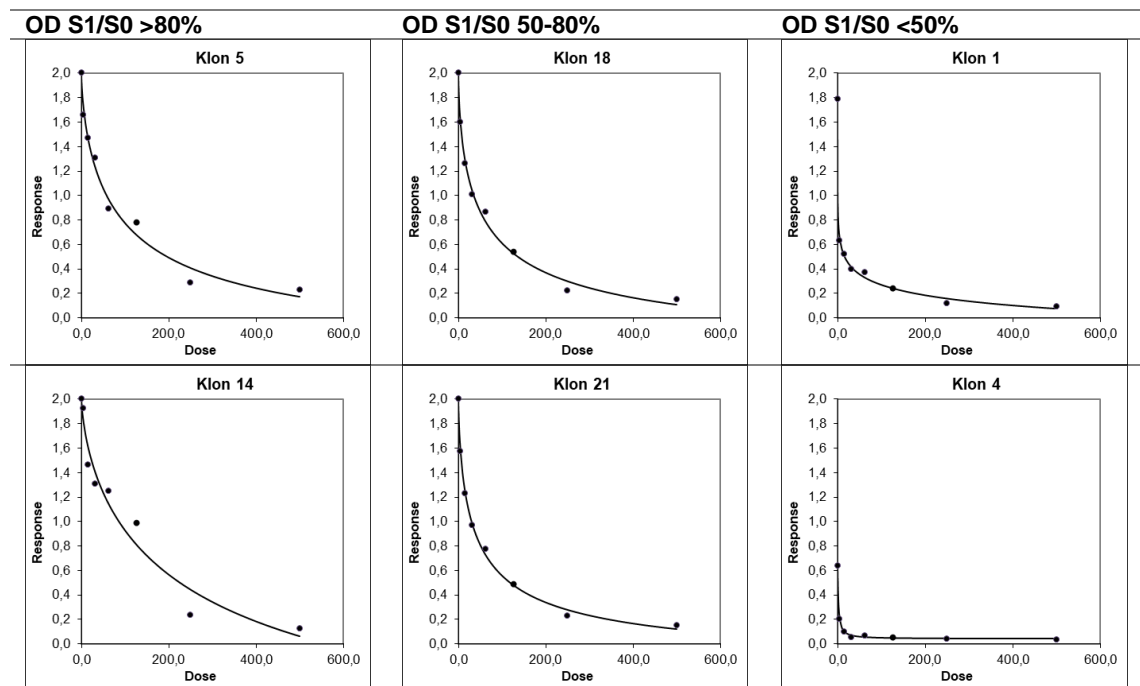
Der Klon 5 zeigt eine sehr flache Kurve. Es gibt kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Standardkonzentrationen. Eine Messung mit diesem Klon ist nahezu unmöglich, da minimale Unterschiede in der OD zu einem großen Unterschied in der ermittelten Konzentration führen. Der Klon 18, welcher einen Quotient S<sub>1</sub>/S<sub>0</sub> von 50 bis 80 % zeigt, hat über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg eine einheitliche Differenzierung. So haben Schwankungen der Messung in jedem Messbereich der Kurve denselben Einfluss auf die ausgegebene Konzentration.

Betrachtet man den Klon 4, so wird deutlich, dass hier die Differenzierung sehr stark wird. Die maximale OD bei S<sub>0</sub> beträgt nur 0,6, bei Zugabe des Analyts sinkt diese aber direkt auf 0,12. Dieser Klon wäre gut geeignet, um einen sehr sensitiven Test zu etablieren. Die Anforderungen an den zu entwickelten Test sind mit diesem Antikörper allerdings nicht zu erfüllen.

Die Klone in der Kategorie OD S1/S0 <50 % sind nicht für den Aufbau eines Assays geeignet, da sich die OD durch den Wechsel des Assayformats sehr stark verändert. Dies zeigt einen starken Einfluss des freien Antibiotikums und auch des Verdünnungspuffers auf diese Klone. Beispielsweise zeigte der Klon 1 eine sehr hohe OD auch in hohe Verdünnungen hinauf, wenn er nur an das auf der Platte befindliche Konjugat (BSA-Linezolid) binden sollte. Kommt aber der Kompetitor (freies Linezolid) in das Testsystem, so verschiebt sich die Bindungsaffinität stark in Richtung des freien Antibiotikums. Es ist ein OD-Abfall von >60 % der OD<sub>max</sub> bei einer Kompetitorkonzentration von 5 ng/mL zu beobachten.

Klone, die nur wenig auf den Kompetitor reagieren, sind für die Messung der Konzentrationen der Antibiotika Rückstände im Serum ebenfalls nicht gut geeignet. Die Differenz zwischen einer niedrigen Konzentration des Kompetitors und dem Nullwert (kein Kompetitor ist vorhanden) ist kleiner als 10 % der OD<sub>max</sub> (bspw. Klon 14 OD S1/S0= 92 %, Tabelle 19). Dies führt in der Testentwicklung zu einer schlechten Sensitivität und Spezifität des Tests, so können falsch negative/ positive Ergebnisse auftreten, die das Messergebnis beeinträchtigen oder in Frage stellen.

Tabelle 19: Kompetitionskurven beispielhaft für verschiedene Klone für Linezolid, aufgeteilt in drei Kategorien. Dargestellt ist die OD bei 450 nm/620 nm bei einer zunehmenden Konzentration von Linezolid von 0-500 ng/mL.



Für die Etablierung eines Assays wurden zwei Antikörper ausgewählt. Hierbei wurde zusätzlich die Richtigkeit der Messung von Referenzmaterial mit einbezogen.

Die Klone der Kategorie OD S1/S0 50 bis 80 % wurden erneut begutachtet und Referenzmaterialien gemessen. Dieses Kalibrationsmaterial der Firma EUREKA besteht aus Plasma humanen Ursprungs, welches gespikkt und lyophilisiert wurde.

Die Klone 17, 18 und 21 zeigten in diesem Versuch gute Wiederfindungen der vorgegebenen Zielwerte (Tabelle 20).

Tabelle 20: Messung der EUREKA Kalibratoren mit den zuvor ausgewählten Klonen 17, 18 und 21 gegen Linezolid.

Eureka Kit Kalibratoren Lot 006	Klon 17	Klon 18	Klon 21	Zielwert (ng/mL)	Wiederfindung in %		
Level 0	0,03	0,42	0,14	0,00	-	-	-
Level 1	1,54	1,83	1,71	3,30	46,67	55,45	51,82
Level 2	16,05	19,94	17,42	27,00	59,44	73,85	64,52
Level 3	79,33	76,46	76,63	102,00	77,77	74,96	75,13

Die Klone zeigten alle eine zu niedrige Wiederfindung der Referenzproben. Die Klone 18 und 21 zeigten allerdings im Vergleich zum Klon 17 einheitlichere Werte. Es wurden die Klone 18 und 21 ausgewählt, um im expandierten Maßstab die Antikörperproduktion zu starten.

### 5.3.1.3 Bestimmung der Isotypen der ausgewählten Antikörper für Ceftazidim und Linezolid

Für die Analyse der Isotypen der gewählten Klone wurden Platte wie ich 4.2.5.3 beschrieben vorbereitet.

Tabelle 21: Isotypen-Bestimmung für Ceftazidim Klone CL29 und CL40

<b>Ceftazidim</b>				
<b>Sekundär Antikörper- HRP</b>	<b>Isotyp</b>	<b>CL29</b>	<b>CL40</b>	<b>Negativkontrolle</b>
LO-MG1-2	IgG1	1,890	1,870	0,100
LO-MG2a-3	IgG2a	0,070	0,070	0,070
LO-MG2b-2	IgG2b	0,080	0,080	0,080
LO-MG3-13	IgG3	0,090	0,080	0,080
LO-MM-8	IgM	0,060	0,070	0,070
LO-MK1	kappa	1,300	1,150	0,080

Wie in Tabelle 21 zu sehen ist sind beide, für das Ceftazidim ausgewählte Klone, IgG1 kappa positiv. Die Negativkontrolle bestätigt, dass die Messung des Mediums keine Interferenzen ergab, beziehungsweise die Messungen für die anderen Antikörper-Isotypen im Vergleich zur Negativkontrolle als negativ bestätigt werden können. Dies spricht für eine gute Bindungskapazität und Stabilität dieser Antikörper. Die Entwicklung kann mit diesen Antikörpern weitergeführt werden.

Tabelle 22 Isotypen Bestimmung für Linezolid Klone CL18 und CL21

Linezolid				
Sekundär Antikörper- HRP	Isotyp	CL18	CL21	Negativkontrolle
LO-MG1-2	IgG1	1,600	1,570	0,090
LO-MG2a-3	IgG2a	0,060	0,060	0,070
LO-MG2b-2	IgG2b	0,090	0,080	0,060
LO-MG3-13	IgG3	0,080	0,090	0,060
LO-MM-8	IgM	0,070	0,070	0,070
LO-MK1	kappa	0,940	1,000	0,080

Wie in Tabelle 22 zu sehen ist sind beide, für das Linezolid ausgewählte Klone, IgG1 kappa positiv. Die Negativkontrolle bestätigt auch hier, dass die Messungen für die anderen Isotypen als negativ zu bewerten ist. Die Entwicklung kann mit diesen Antikörpern weitergeführt werden.

## 5.4 Austesten des Testformats

Der Aufbau des Testformats für einen kompetitiven ELISA-Assay kann auf zwei Weisen erfolgen. Zum einen kann der Antikörper auf die feste Phase gebunden werden und ein HRP- markierter Kompetitor zur Detektion verwendet werden. Im anderen Fall würde der Kompetitor an die feste Phase gebunden werden und der Antikörper mit HRP markiert und zur Detektion verwendet werden. Dies ist für beide Assays zu prüfen.

### 5.4.1 Austesten des Testformats für Ceftazidim

In Vorbereitung der Austestung der Testformate wurde wie in 4.2.7 beschrieben die Konjugation der ausgewählten Antikörper durchgeführt.

#### 5.4.1.1 Testsystem 1: Antibiotikum- HRP- Format

##### 5.4.1.1.1 Optimierung des Testsystems

Zur Prüfung, ob dieses Testsystem geeignet ist für die Etablierung des Ceftazidim ELISAs wurde zunächst die Mikrotiterplatte mit dem Antikörper aus dem Klon 29 und dem Klon 40 beschichtet. Die Beschichtung erfolgte nach dem Protokoll, welches in 4.2.8.1 beschrieben wurde. Das Testsystem besteht aus der antikörperbeschichteten MTPL, einem Ceftazidim-HRP Konjugat (Squarix) und dem freiem Ceftazidim, welches sich in der Standardlösung befindet (Abbildung 21). Das freie Ceftazidim kompetiert nun mit dem an HRP-gebundenem Ceftazidim um die Bindung an den Antikörper. So lässt sich antiproportional zur Bindung des Antikörpers an die Platte die Konzentration des Ceftazidims in der Lösung detektieren.

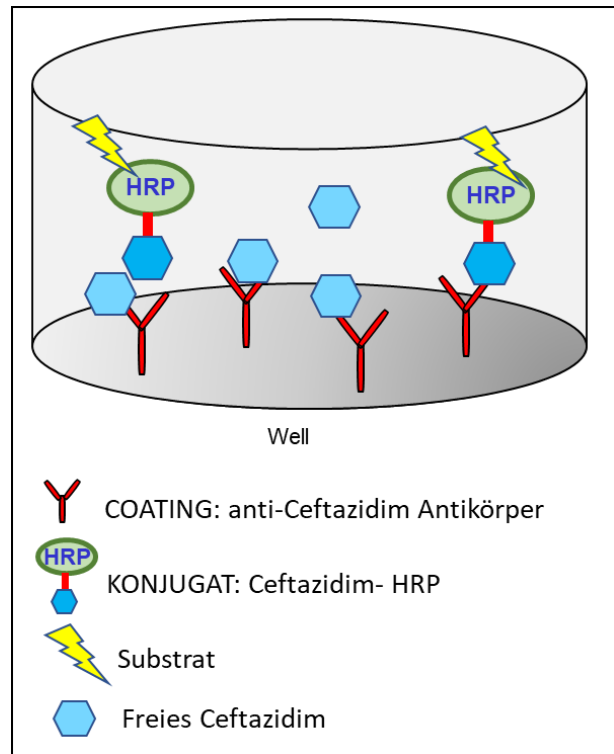


Abbildung 21: Testformat für Ceftazidim mit antikörperbeschichteter MTPL

Die Standardkurven, die mit den beiden Antikörpern abzubilden sind, unterscheiden sich bei gleicher Abarbeitung des Tests (4.2.8.3). Das Testsystem mit dem Antikörper CL29 zeigt eine geringere  $OD_{max}$  ( $OD_{S0}$ ). Des Weiteren fällt auf, dass die Kurve sich flacher darstellt. Vergleicht man die Quotienten der ODs für die einzelnen Standards (Ratios) mit denen der Standardkurve mit dem CL40, so ist allerdings nur ein geringer Unterschied feststellbar.

Wird der CL40 als Antikörper auf der Platte verwendet, so zeigt er im Vergleich zum CL29 eine deutlich höhere  $OD_{max}$ . Diese liegt mit 2,04 rund 35 % höher als bei der Verwendung des CL29.

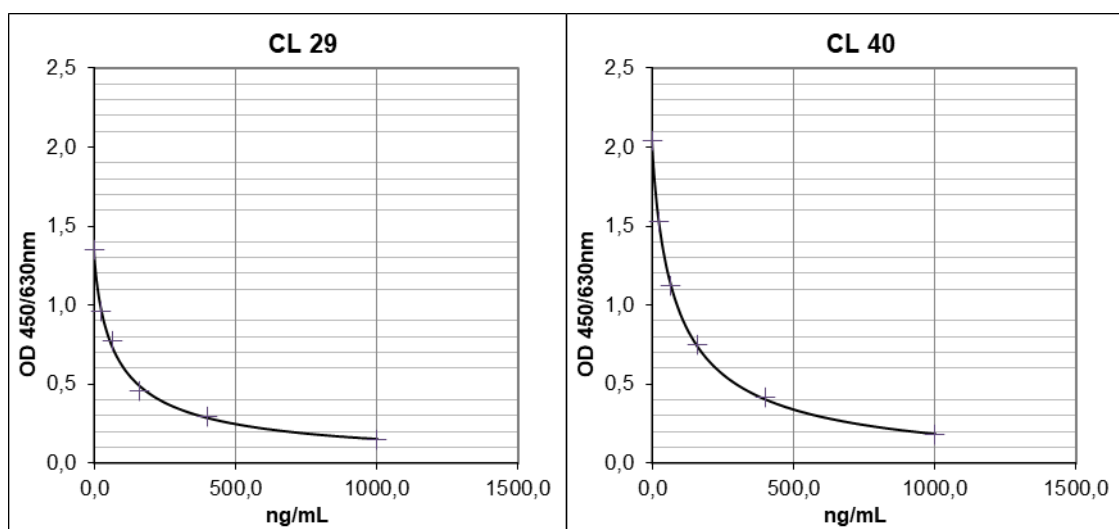




Abbildung 22: Standardkurve mit dem Antikörper-Format. Als Konjugat wurde Ceftazidim-HRP von Squarix eingesetzt.

Tabelle 23: Spezifikationen der Standardkurven in Abhängigkeit des zur Beschichtung genutzten Antikörpers.

Ceftazidim (ng/mL)	CL29		CL40	
	OD 450/630 nm	Ratio/ S0 (%)	OD 450/630 nm	Ratio/ S0 (%)
0	1,35	100	2,04	100
25	0,96	71	1,53	75
64	0,77	57	1,12	55
160	0,46	34	0,75	37
400	0,30	22	0,42	20
1000	0,15	11	0,18	9

Die weiteren Versuche der Optimierung dieses Testsystems werden nun mit CL40 fortgeführt. Dieser Klon zeigt eine deutlich höhere  $OD_{max}$  im Vergleich zu CL29. Dies ist gut, denn so kann auch mit wenig Materialeinsatz eine ausreichende  $OD_{max}$  erreicht werden. Zusätzlich zeigt der CL40-Antikörper einen größeren Kurvenbereich, der abgedeckt wird. Beim Max- Standard von 1000 ng/mL bleibt immer noch Spielraum, um die Kurve erneut anzupassen oder zu verändern, falls höhere Konzentrationsbereiche abgedeckt werden müssen.

Zunächst war zu testen, welche Plattenbeschichtung für den Aufbau des Testsystems geeignet ist. Es wurden Platten mit absteigender Konzentration des CL40 Antikörpers beschichtet. Begonnen wurde mit 2  $\mu\text{g/mL}$ , des Weiteren wurden 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$  und 0,75  $\mu\text{g/mL}$  betrachtet. Zunächst lässt sich festhalten, dass die  $OD_{max}$  abhängig von der Konzentration des auf der Platte befindlichen Antikörpers ist.

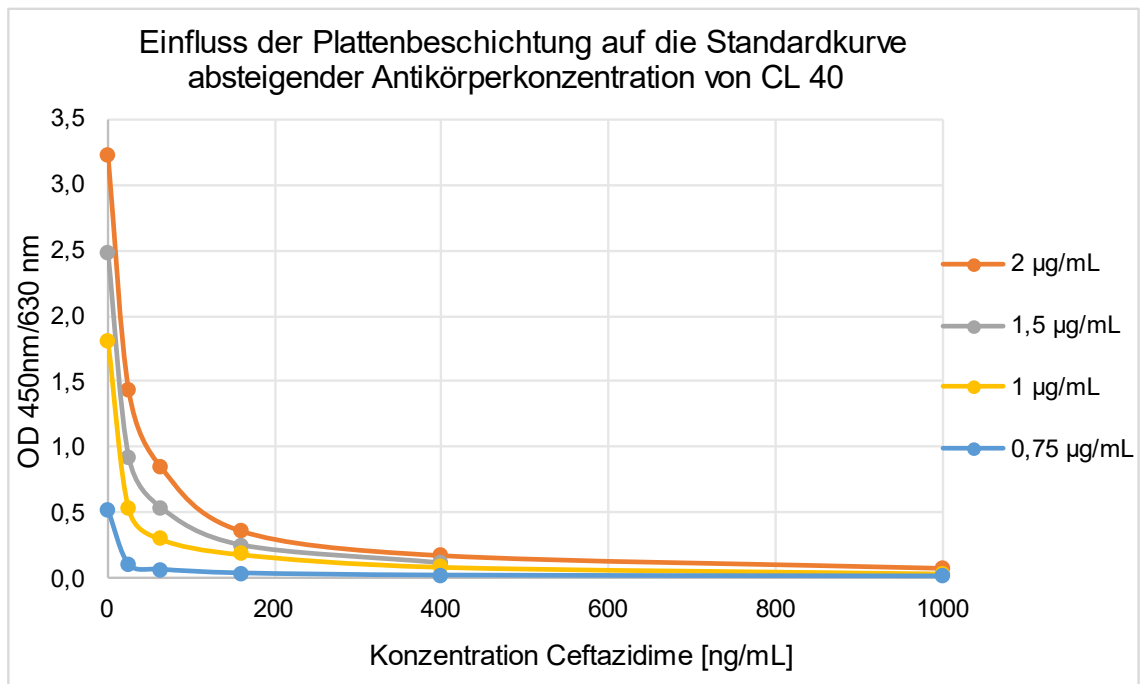
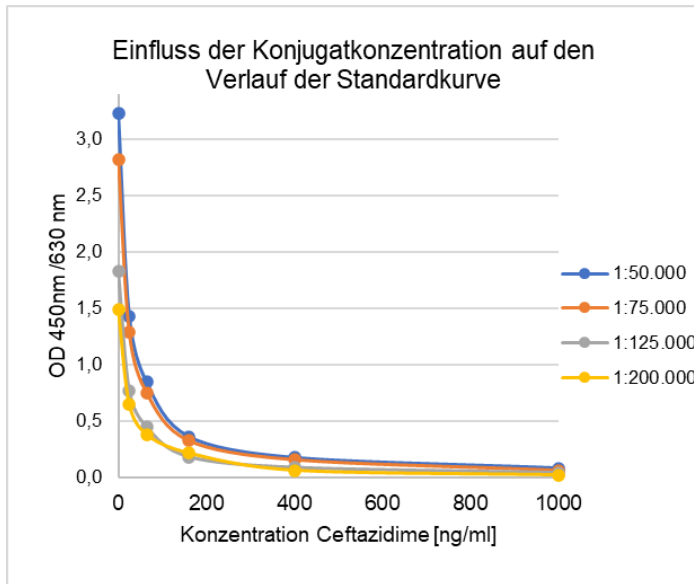


Abbildung 23: Einfluss der Konzentration des Beschichtungsantikörpers auf die Standardkurven (2,0 - 0,75 µg/mL). Als Konjugat wurde Ceftriaxim HRP in einer Verdünnung von 1:50000 (20 ng/mL) in Stabilzyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O eingesetzt.

Bei genauer Betrachtung fällt zusätzlich auf, dass die Ratios von S<sub>0</sub> zu S<sub>1</sub> (erste Konzentration; 25 ng/mL) größer wird, je weniger Antikörper auf der Platte beschichtet ist. Bei einer Beschichtung von 2 µg/mL ist die Ratio von 0 ng/mL zu 25 ng/mL 44 % (Abbildung 24: Einfluss der Konjugatkonzentration auf den Verlauf der Standardkurve auf einer Platte mit 2 µg/mL CL40. Getestet wurden Verdünnungen 1:50.000 (20ng/mL), 1:75.000 (13,3 ng/mL), 1:125.000 (8 ng/mL) und 1:200.000 (5 ng/mL).

Tabelle 24). Sinkt die Beschichtungskonzentration auf 0,75 µg/mL so erhält man eine Ratio von 20 %.

Die abgebildete Kurve wird demnach mit absteigenden Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers immer steiler, sodass sich der Bereich der Kurve, der für die Messung der Proben bleibt, drastisch verkleinert, dies hat zur Folge, dass die Kurven im höheren Konzentrationsbereich flach sind und somit bei wenig OD-Differenz eine große Messungenauigkeit auftritt (Abbildung 23). Dies sollte vermieden werden.



Für die weitere Etablierung des Formats wurde zunächst mit der 2 µg/mL beschichteten Platte fortgefahren.

Abbildung 24: Einfluss der Konjugatkonzentration auf den Verlauf der Standardkurve auf einer Platte mit 2 µg/mL CL40. Getestet wurden

Verdünnungen 1:50.000 (20ng/mL), 1:75.000 (13,3 ng/mL), 1:125.000 (8 ng/mL) und 1:200.000 (5 ng/mL).

Tabelle 24: Prozentuale OD-Abnahme im Vergleich zum Nullstandard (OD<sub>max</sub>) in Abhängigkeit der verschiedenen Plattenbeschichtungs-Konzentrationen. Als Probe wurde eine Standardreihe aus freiem Ceftazidim in ng/mL verwendet.

Konzentration des AK auf der Platte Ceftazidim [ng/mL]	2 µg/mL		1,5 µg/mL		1 µg/mL		0,75 µg/mL	
	OD 450/630 nm	Ratio (%)	OD 450/630 nm	Ratio (%)	OD 450/630 nm	Ratio (%)	OD 450/630 nm	Ratio (%)
0	3,23	100%	2,48	100%	1,81	100%	0,52	100%
25	1,43	44%	0,92	37%	0,53	29%	0,10	20%
64	0,85	26%	0,53	22%	0,30	17%	0,06	13%
160	0,37	11%	0,25	10%	0,19	10%	0,04	7%
400	0,18	6%	0,11	5%	0,09	5%	0,02	4%
1000	0,08	3%	0,05	2%	0,04	2%	0,01	3%

Um die richtige Konjugatkonzentration für die weiteren Versuche auszutesten, wurde das Konjugat für die zuvor festgelegte Plattenbeschichtungs-Konzentration austitriert.

Dafür wurde eine Verdünnungsreihe des Konjugats mit der schon zuvor verwendeten Standardkurve gemessen. Die OD<sub>max</sub>, welche bei etwa 2 liegen sollte, wird mit einer Verdünnung von 1:125.000 (8 ng/mL) beinahe erreicht (1,82). Die Kurvenform scheint allein durch die Plattenbeschichtungs-Konzentration beeinflusst zu werden, da die Ratios der verschiedenen Konjugatkonzentration nahezu identisch sind.



Tabelle 25: Einfluss der Konjugatkonzentration auf die Standardkurven auf einer Platte mit 2 µg/mL. Gezeigt sind die realen ODs und die Ratios (%) zu OD<sub>max</sub>.

Konjugat-konzentration	1:50.000 (20 ng/mL)		1:75.000 (13,3 ng/mL)		1:125.000 (8 ng/mL)		1:200.000 (5 ng/mL)	
	OD 450/630 nm	Ratio (%)	OD 450/630 nm	Ratio (%)	OD 450/630 nm	Ratio (%)	OD 450/630 nm	Ratio (%)
0	3,23	100%	2,82	100%	1,82	100%	1,49	100%
25	1,43	44%	1,29	46%	0,77	42%	0,65	44%
64	0,85	26%	0,75	27%	0,45	25%	0,39	26%
160	0,37	11%	0,33	12%	0,18	10%	0,22	15%
400	0,18	6%	0,16	6%	0,09	5%	0,07	4%
1000	0,09	3%	0,06	2%	0,04	2%	0,02	2%

Eine Messung der Kurven auf der zuvor festgelegten Plattenbeschichtungskonzentration von 2 µg/mL zeigt, dass eine Konjugatkonzentration von 8 ng/mL ausreichend ist, um ein Testformat für die weiteren Vorversuche festzulegen.

#### 5.4.1.1.2 Stabilitätsprüfung der Einzelkomponenten

Um zu prüfen, ob dieses Testsystem robust genug ist, um eine Haltbarkeit von mindestens 12 Monaten zu erreichen, wird eine beschleunigte Haltbarkeitsprüfung durchgeführt. Zunächst wird eine Stabilitätsprüfung der Einzelkomponenten durchgeführt, um zu erkennen, welches die an der wenigstens stabilen Komponente des Tests ist.

Für die Prüfung der Konjugatstabilität wurde das Ceftazidim-HRP Konjugat in drei verschiedenen Konjugatpuffern verdünnt. Zum einen wurde Stabilzyme HRP von der Firma Surmodics verwendet. Zusätzlich wurde das Konjugat in HRP Protector proteinfree und HRP Protector + 3 % BSA von der Firma Candor hergestellt. Alle Konjugatansätze haben die gleiche Konzentration, um eine gute Vergleichbarkeit der stabilisierenden Wirkung sicherzustellen. Ein zweiter kritischer Bestandteil des Assays ist der Standard. Hierfür wird der Standard in 10 verschiedenen Puffern hergestellt. Diese unterscheiden sich zum einen in ihrer Zusammensetzung als auch in ihrem pH- Wert. Es soll ein möglichst großer Bereich abgedeckt werden, da der Standard unabhängig vom Testsystem verwendet werden kann. Alle anderen Komponenten werden jeweils bei 4 °C gelagert und verwendet.

#### 5.4.1.1.3 Stabilitätsprüfung Konjugat Ceftazidim-HRP

Für die Stabilitätsprüfung des Konjugats in verschiedenen Puffern wurde nach drei Tagen Lagerung bei 40 °C die erste Messung der Konjugate durchgeführt.

Im Vergleich zu Tag 0 ist nach einer Lagerung von drei Tagen im Kühlschrank schon eine Veränderung der Standardkurve zu bemerken.

Die maximale OD (0 Standard) ist in allen drei Puffern abgesunken. Es fällt allerdings deutlich auf, dass sich die Standardkurve verändert. Die niedrig konzentrierten Standards zeigen im Vergleich zum Tag 0 eine deutlich höhere OD, was dafürspricht, dass die Bindung nicht mehr so

effizient funktioniert, wie zuvor. Es könnte sein, dass durch eine Konformationsänderung des Ceftazidim Moleküls die Competition schlechter funktioniert. Je höher die Konzentration des Ceftazidims, desto vergleichbarer ist die Standardkurve zu Tag 0.

Betrachtet man die bei 40 °C gelagerten Konjugate, sieht man eine signifikante Abnahme der OD über alle Konzentrationsbereiche hinweg. Das Konjugat im Stabilzyme HRP Puffer zeigt noch eine Restaktivität von im Mittel 43 %.

Bei den beiden HRP Protector Puffern, mit und ohne Protein, bleibt nur noch eine Restaktivität von 20 % und 18 %. Es ist außerdem zu sehen, dass die bei 4 °C gelagerten Konjugate jetzt etwas höhere ODs zeigen. Da dies allerdings einheitlich in allen drei Puffern auftritt, ist hier davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine Messabweichung handelt. Da keine ausreichende Stabilität mit dem Antibiotika-HRP Konjugat zu gewährleisten ist, muss das Testformat ausgetauscht werden.

Ceftazidim ist in der Literatur beschrieben als nicht stabil in Lösung beschrieben. Daher scheint es für eine Änderung des Testsystems eine gute Möglichkeit, das Antibiotikum zur Beschichtung der Platte zu verwenden, da diese bis zur Benutzung getrocknet ist. Da Ceftazidim als Pulver und Lyophilisat, als Medikament oder Referenzmaterial eine gute Haltbarkeit zeigt, sollte die Stabilität des Ceftazidims durch die den trockenen Zustand besser gewährleistet werden können.

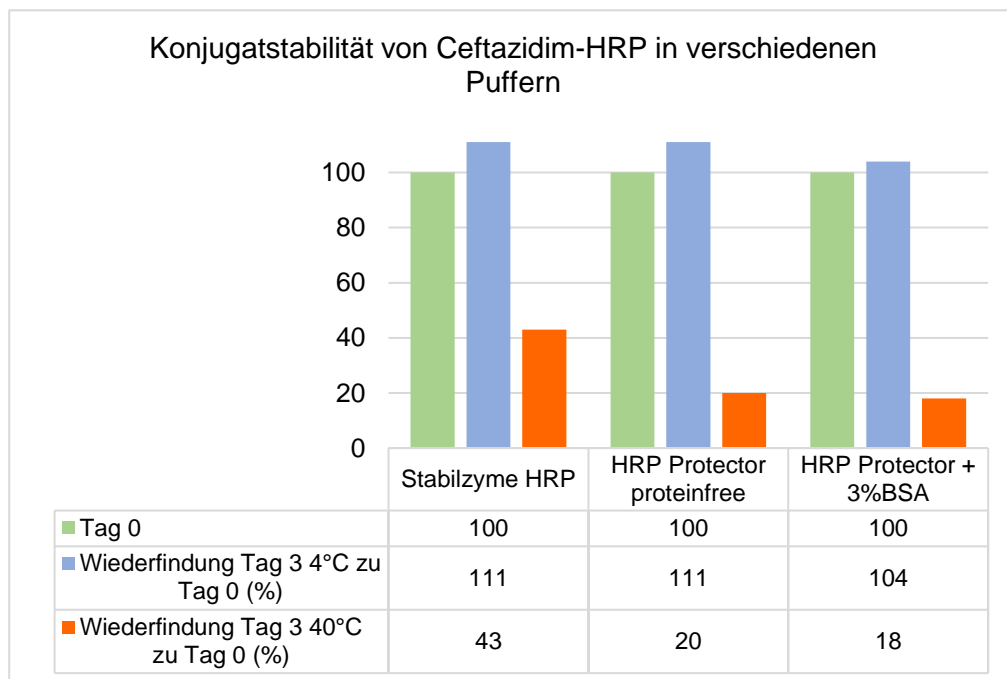


Abbildung 25: Stabilität des Ceftazidim HRP Konjugats nach drei Tagen bei einer Lagerung bei 4°C und 40°C in verschiedenen Puffern.

5.4.1.1.4 Stabilitätsprüfung Standardmaterials

Die Stabilität des Standards wurde bei drei verschiedenen Lagerungstemperaturen getestet. Zum einen wurde die Lagerung bei 4 °C geprüft, zum anderen wurden die Lösungen bei 40 °C gelagert, um wie oben beschrieben die Langzeithaltbarkeit zu prüfen. Zusätzlich wurden die Standards auch gefroren und bei -20 °C gelagert, um als Alternative eine Lyophilisierung anzustreben, falls die Stabilitätsprüfung in Lösung nicht erfolgreich ist.

Alle Stabilitätsprüfungen wurden in verschiedenen Puffern durchgeführt, die einen pH- Wert von <5 bis >8 haben. Außerdem wurden die Puffer mit und ohne die Zugabe von Protein, in diesem Fall Bovines Serum Albumin, ausgetestet (Tabelle 26). Die von DRG hergestellten Puffer wurden alle als 20 mM Lösung hergestellt, um eine optimale Pufferwirkung im gewünschten pH-Fenster zu erreichen.

Tabelle 26: Ceftazidim-Standard Material Stabilitätsprüfung in folgenden Puffern, mit angegebenen pH-Werten.

	Puffer	pH-Wert	Hersteller
1	Phosphat-P. pH 4,78	4,78	DRG
2	Phosphat-P. pH 4,78 +1% BSA	5,40	DRG
3	Phosphat-P. pH 5,97	5,97	DRG
4	Phosphat-P. pH 5,97 +1% BSA	6,02	DRG
5	Stabilzyme Select pH 6,8	6,80	Surmodics
6	Low Cross proteinfree pH 6,8	6,80	CANDOR
7	Antibody Stabilizer TRIS pH 7,2	7,20	CANDOR
8	Phosphat-P. pH 7,8 +1% BSA	7,80	DRG
9	Phosphat-P. pH 7,8	7,80	DRG
10	SLV Standardmatrix pH 8,3	8,30	DRG

Die erste Prüfung der Standards erfolgte nach einem Tag Lagerung bei 40 °C und -20 °C. Die bei 4 °C gelagerten Standards zeigen keinen Abbau nach einem Tag. Allerdings zeigt sich schon nach einem Tag Lagerung bei 40 °C ein teilweise starker Abbau (Abbildung 26). So zeigte der Phosphatpuffer mit dem pH-Wert von 4,78 nach einem Tag bereits einen Abbau von 32 %. Im ähnlichen Rahmen baute der Standard auch in den Puffern Stabilzyme Select (34 %), Low Cross proteinfree (21 %).

Besonders stark baute der Standard in den Puffern mit dem hohen pH-Wert ab. In dem Phosphatpuffer mit dem pH-Wert von 7,8 zeigte der Standard nach einem Tag bei 40 °C einen Abbau von 64 %. Auch in der SLV-Standardmatrix, deren pH-Wert noch höher ist, war ein Abbau von 69 % beobachtet. Alle weiteren Puffer zeigten nach einer Lagerung von einem Tag bei 40 °C gute stabilisierende Eigenschaften, allerdings zeigen die Puffer mit BSA in allen Fällen bessere Werte als ohne. Nach sieben Tagen Lagerung bei 40 °C zeigten alle Standardansätze in verschiedenen Puffern einen deutlichen Abfall der Aktivität. Nur der Standard im Phosphatpuffer mit pH 4,78 und 1 % BSA zeigt noch eine Aktivität über 80 % nach sieben Tagen bei 40 °C. Das Einfrieren der Standards wäre in mehreren Puffern möglich. Hier zeigt der Phosphatpuffer mit pH 4,78 mit 1 % BSA auch eine sehr gute stabilisierende Wirkung. Bei einer Lagerung von sieben Tagen bei -20 °C liegt die Aktivität bei 102 %. Auch andere Puffer zeigten eine gute stabilisierende Wirkung bei -20°C. Diese Puffer, wie zum Beispiel die SLV-Standardmatrix mit einem pH von 8,3, sind zwar gut für die Lagerung bei -20 °C geeignet, zeigen aber bei einer Lagerung bei hohen Temperaturen keine guten Stabilisierungseigenschaften. So sinkt die Aktivität nach einem Tag bei 40 °C bereits auf nur noch 31 %.

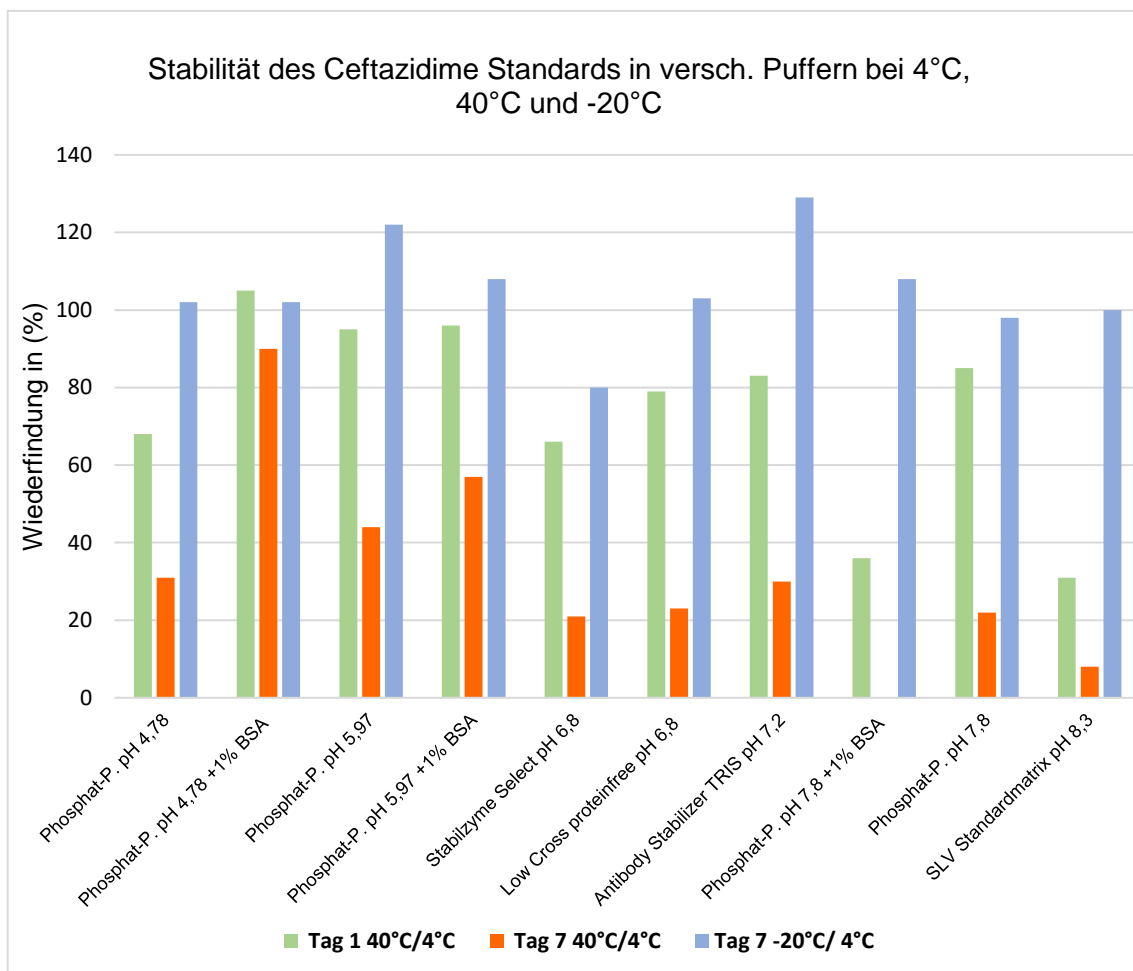




Abbildung 26: Stabilität der Standards in verschiedenen Puffern. Gezeigt wird die prozentuale Wiederfindung an Tag 1 und Tag 7 bei 4, 40 °C und bei -20 °C.

Auf Grundlage dieser Daten wurde dazu übergegangen die Standards zu lyophilisieren, um eine bessere Langzeitstabilität zu gewährleisten. Für die Gefriertrocknung wurde der Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 4,78 + 1% BSA gewählt, um auch die bestmögliche Stabilität im rekonstituierten Zustand zu garantieren. Die Instabilität des Ceftazidims bei Lagerung in Flüssigkeiten ist auch in der Literatur als kritisch beschrieben, so ist auch die Haltbarkeit in Infusionslösungen beschränkt auf eine Administration in einem Zeitfenster von 24 h (Jones et al., 2019).

### 5.4.1.1.5 Stabilitätsprüfung des Standardmaterials nach Lyophilisation

Aus den vorherigen Versuchen ging hervor, dass ein Puffer mit einem geringen pH-Wert am besten für die Lagerung des Standardmaterials geeignet ist. Zusätzlich erwies sich die Anwesenheit von BSA in der Lösung als positiv. So wurde der Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 4,8 hergestellt und mit 1 % BSA ergänzt. Um bei der Lyophilisation ein festes Pellet zu erhalten, wird der Lösung noch 4 % D- Mannitol hinzugefügt. Final wurde der pH-Wert bei 5,2 gemessen. Die Stabilitätsprüfung wurde bei 4 °C und 40 °C durchgeführt. Parallel dazu wurde ein Aliquot mit gelöstem Standard mitgeführt. Des Weiteren wurde auch die Lagerung des rekonstituierten Standards bei -20 °C geprüft.

Die Stabilität des Standards wird anhand der Konzentration der Kontrollen geprüft. Diese bestehen aus demselben Material und werden im späteren Assay benötigt.

Für die Stabilität der Standards wurde ein Kriterium von 20 % Abweichung von dem an Tag 0 ermittelten Wert angesetzt. Zusätzlich ist es wichtig, dass sowohl die Stabilität bei 4 °C als auch bei 40 °C gewährleistet ist. Dies ist grundlegend, um sowohl die Lagerung bei 4 °C als auch die beschleunigte Haltbarkeit zu prüfen (40 °C). Nach sieben Tagen Lagerung bei 40 °C zeigen die lyophilisierten Kontrollen einen Abbau von 5 % im niedrigen Konzentrationsbereich und von ca. 20 % im hohen Konzentrationsbereich. Das nicht lyophilisierte Material zeigt nach sieben Tagen im Durchschnitt noch eine Aktivität von 71,5 % im Vergleich zu Tag 0. Nach 14 Tagen zeigt sich kaum eine Veränderung an der Stabilität der lyophilisierten Kontrollen bei 40 °C. Auch die Lagerung der rekonstituierten Kontrollen bei -20 °C ist gewährleistet.

Generell ist aber festzustellen, dass die Kontrollen im oberen Konzentrationsbereich mehr abbauen als die niedrigen. Dasselbe Bild zeichnet sich auch bei der Standardkurve ab. Die Standards im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich bis 160 ng/mL zeigen einen Abbau bis zu etwa 80 % der ursprünglichen OD (Abbau -20 %). Dann zeigt die Abbaurate allerdings an auf bis zu 35 %. Das erklärt auch, wieso die niedrige Kontrolle in allen Fällen besser bestimmt wurde.

Obwohl die ODs der Kontrollen im gleichen Maße anstiegen, wurden die konzentrationsabhängigen Effekte deutlich. Dies deckt sich mit einer Beobachtung, die Fubara et al. gemacht haben. Auch sie haben gesehen, dass eine höhere Konzentration von Ceftazidim auch zu einer höheren Abbaurate führte. Diese konnte aber nicht eindeutig geklärt werden. Es

wurde nur festgestellt, dass die Hydrolyse des Ausgangsmoleküls nicht der Hauptgrund war (Fubara & Notari, 1997).

Es wurde festgelegt, dass mit dem lyophilisierten Standard fortgefahren wird. Dieser zeigt im Vergleich zu dem gebrauchsfertigen Standard einen deutlichen Stabilitätsvorteil. Mit der bestätigten Stabilität von 7 Tagen bei 40 °C ist von einer Haltbarkeit von einem Jahr bei gekühlter Lagerung (2-8 °C) auszugehen.

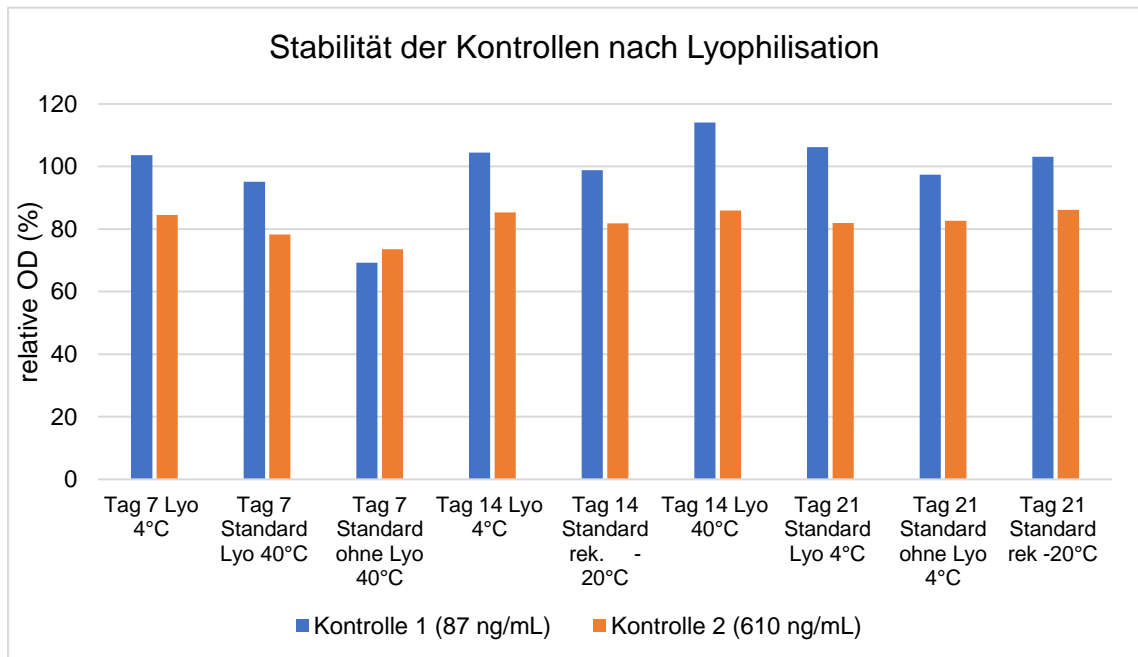


Abbildung 27: Standardstabilität anhand der Kontrollen nach Lyophilisation. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Lagerung nach 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen.

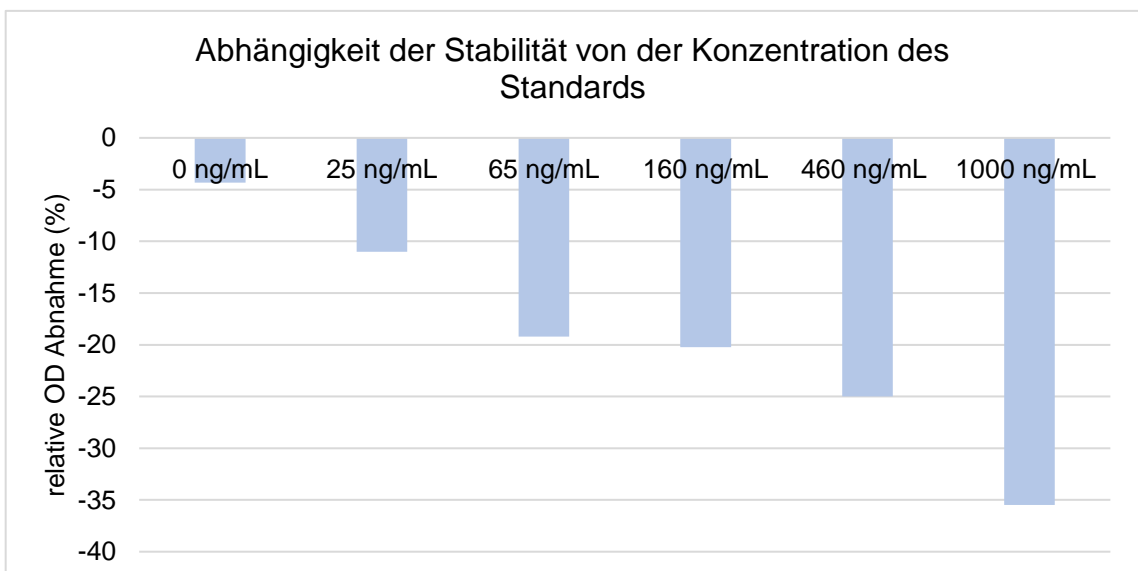


Abbildung 28: relative OD-Abnahme in % in Abhängigkeit der Konzentration des Standards. Gezeigt sind Ergebnisse des 7 Tage bei 40 °C gelagerten Lyophilisats.

5.4.1.2 Testsystem 2: Antikörper- HRP Konjugat Format

Die Stabilitätsprüfung des Testsystems mit der antikörperbeschichteten zeigte eine schlechte Stabilität, da das Ceftazidim-HRP Konjugat nicht in Lösung stabil gehalten werden konnte.

In diesem Testformat wird das Ceftazidim an ein Carrierprotein gebunden (BSA), um es an der Platte zu immobilisieren. Die Stabilität des Antibiotikums ist im getrockneten Zustand, laut Hersteller (Sigma-Merck) für zwei Jahre gewährleistet.

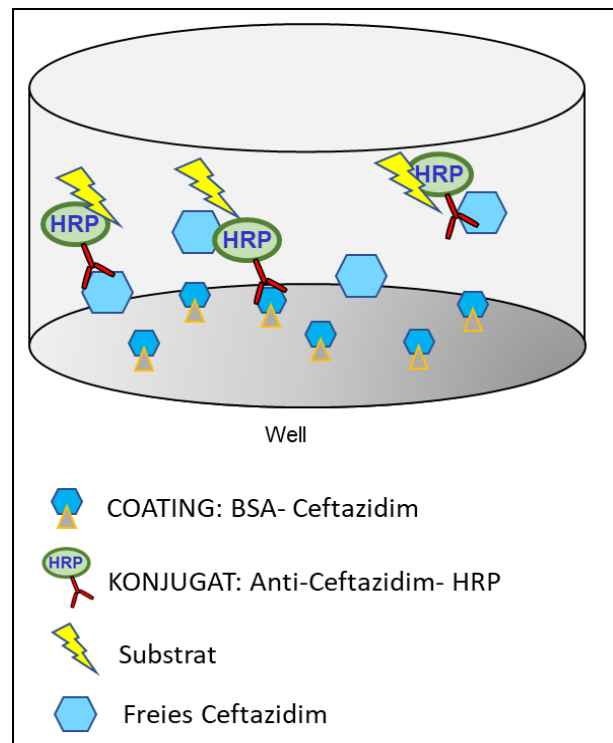


Abbildung 29: schematische Darstellung des Testformats mit Antikörper Konjugat.

5.4.1.3 Optimierung des Testsystems

Für die Beschichtung der MTPLs wurden verschiedene Beschichtungspuffer mit aufsteigendem pH-Werts ausgetestet, da in den Versuchen zur Standardstabilität beobachtet werden konnte, dass das Antibiotikum in Abhängigkeit des pH-Werts verschiedene Stabilitäten zeigt. Die Titration der Plattenkonzentration wurde mit einem sauren Puffer bei pH 2,9 und pH 4,2, einem neutralen Puffer bei pH 7,2, sowie mit einem basischen Puffer mit dem pH-Wert 9,6 durchgeführt.

Auffällig ist dabei, dass die  $OD_{max}$  bei gleicher Beschichtungskonzentration in Abhängigkeit vom pH-Wert ansteigt, nach dem erreichten Optimum aber auch wieder sinkt. So zeigt die mit pH 2,9 beschichtete Platte eine  $OD_{max}$  von 1,00 bei einer Messung von 450 nm/ 630 nm. Die OD bei der mit pH 7,2 beschichteten Platte ist bei 1,46.

Die Beschichtung bei pH 7,2 zeigt wiederum auch eine höhere OD als die Beschichtung bei pH 9,6. Das lässt darauf schließen, dass es ein Optimum, in Abhängigkeit von dem pH-Wert der Beschichtung, gibt.

Mit dem Beschichtungspuffer bei einem pH von 7,2 wurde anschließend eine Titration durchgeführt. Zwischen einer Beschichtung von 2 µg/mL und 1,5 µg/mL war kein Unterschied zu erkennen. Die OD<sub>max</sub> ist mit diesen Beschichtungen beinahe identisch, auch die Kurvenverläufe gleichen sich.

Ab einer Beschichtung von 1 µg/mL sieht man einen Unterschied in der maximalen OD. Der Kurvenverlauf, bleibt aber von den Abständen zwischen den Punkten gleich. Ein Beschichtungskonzentration von 0,5 µg/mL ist nicht ausreichend, da sich gerade im niedrigen Konzentrationsbereich keine ausreichende Differenzierung der Standardpunkte zeigt. Eine Plattenbeschichtung mit 1 µg/mL bei einem pH-Wert von 7,2 für die weiteren Versuche gewählt.

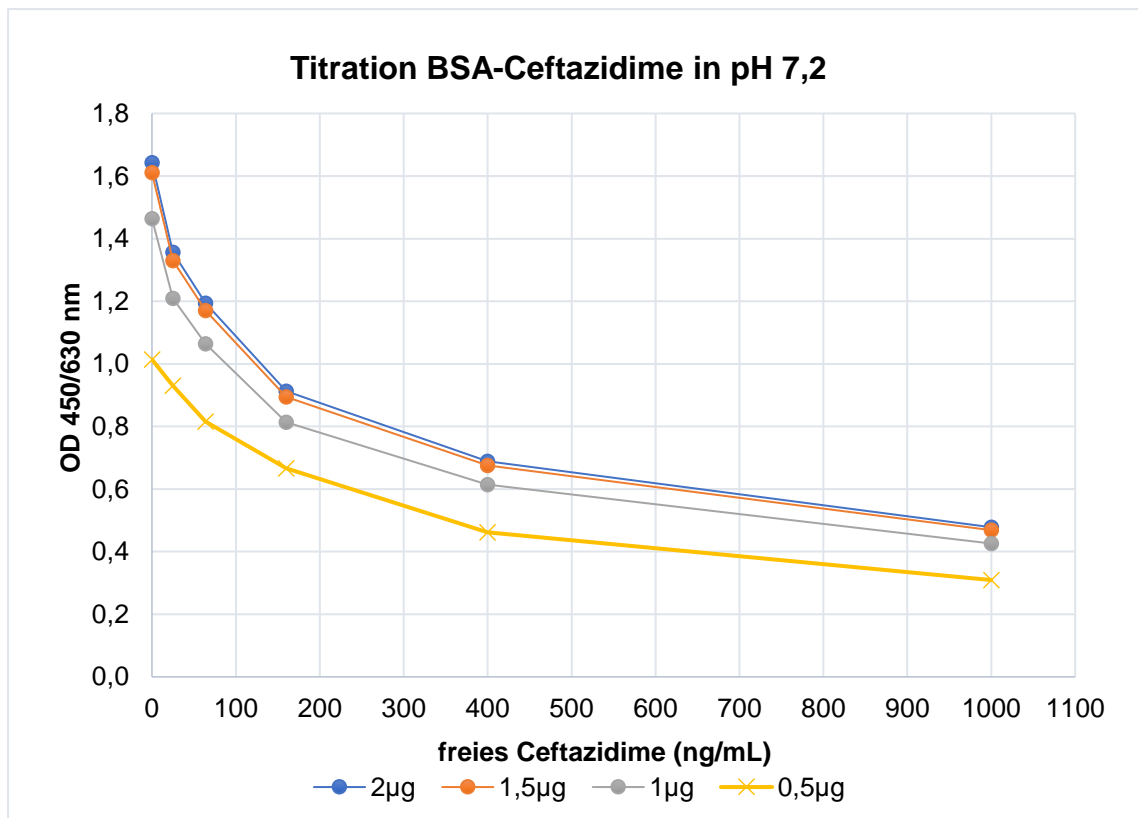


Abbildung 30: Einfluss der BSA-Ceftazidim-Konzentration auf die Standardkurven. Als Konjugat wurde CL40- anti-Ceftazidim-HRP in einer Verdünnung von 1:30.000 (3,95 ng/mL) in Stabilzyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O eingesetzt.

Bei der Titration des Konjugates zeigt sich, dass eine Konzentration des Antikörpers von ca. 6 ng/mL optimal ist. Die Kurvenspezifikationen der niedriger konzentrierten Konjugate sind gleich. Wird mehr Konjugat eingesetzt (7,89 ng/mL) verändert sich die Kurve und die Kurvenratios nehmen zu. Dies führt zu einer flacheren Kurve, die potenziell eher zu einer zu hohen Messung der Proben führt. Deutlich wird auch, dass der lineare Bereich des Tests mit einer niedrigen Konjugatkonzentration größer wird. In Abbildung 31 ist zu erkennen, dass der lineare Bereich bei einer Konjugatkonzentration von 7,89 ng/mL erst ab etwa 20 ng/mL beginnt. Die Kurven mit dem niedriger konzentrierten Konjugat zeigen schon direkt zum Beginn der Kurve eine deutliche Abnahme der OD, was darauf hindeutet, dass mit dieser Konfiguration eine gute lineare Verdünnung bis hin zu niedrigen Konzentrationen möglich ist. Eine Konjugatkonzentration von 6 ng/mL (Verdünnung von 1:20.000) ist sowohl mit einer  $OD_{max}$  von 1,97 als auch mit dem linearen Verlauf optimal geeignet.

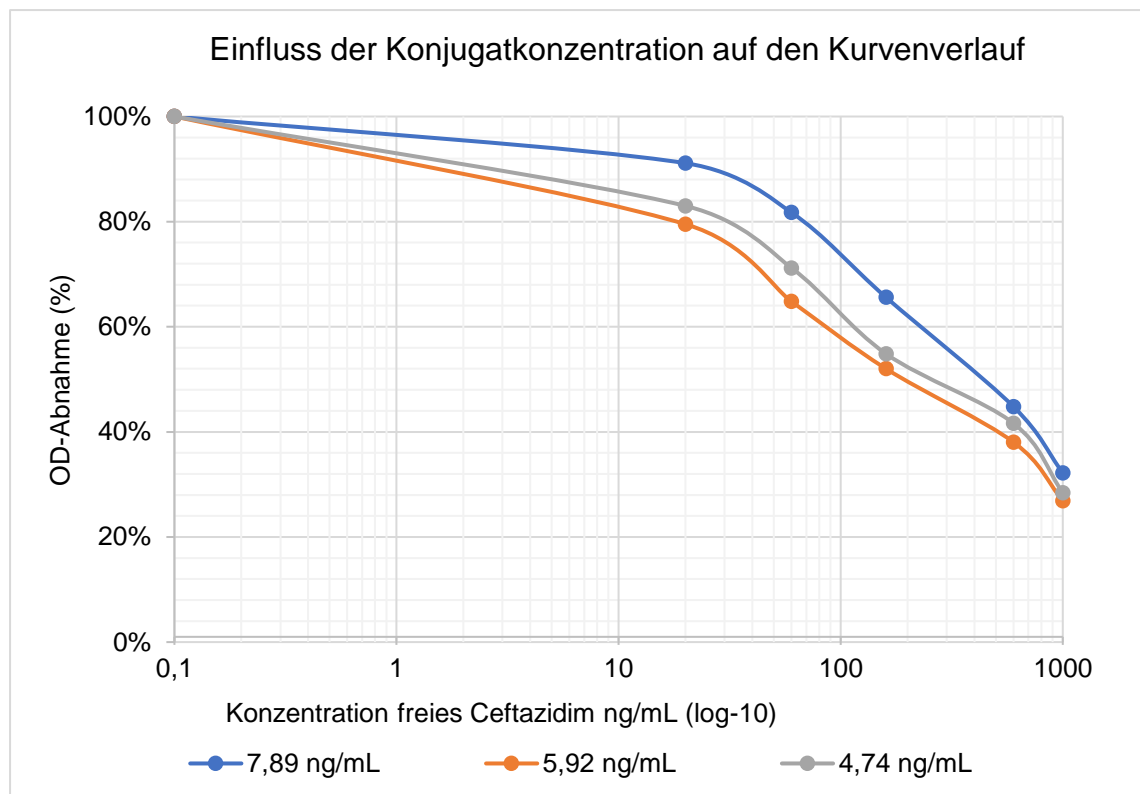


Abbildung 31: Titration des Konjugats CL40 HRP. MTPL ist mit 1 µg/mL BSA beschichtet.

Die Optimierung des Ceftazidim Assays wurde durchgeführt und die Testkomponenten ausgewählt. Die Mikrotiterplatte wird mit 1 µg/mL BSA-Ceftazidim in PBS pH 7,4 beschichtet. Als Konjugat wird der Antikörper CL40 konjugiert an HRP verwendet. Dieser wird in einer Konzentration von 6 ng/mL, was einer Verdünnung des Stocks (118,4 µg/mL) von 1: 30.000 entspricht.

## 5.4.2 Austesten des Testformats für Linezolid

### 5.4.2.1 Testsystem 1: Antibiotikum-HRP – Format

Zur Prüfung, ob dieses Testsystem geeignet für die Etablierung des Linezolid ELISAs, ist wurde zunächst die Mikrotiterplatte mit dem Antikörper aus dem Klon 18 beschichtet. Die Beschichtung erfolgte nach dem Protokoll, welches in 4.2.8.1 beschrieben wurde, mit einer Konzentration von 1 µg/mL. Das Testsystem besteht aus der Antikörperbeschichteten MTPL, einem Linezolid-HRP Konjugat (Squarix) und dem freien Linezolid, welches sich in der Standardlösung befindet. Zunächst war zu testen, welche Plattenbeschichtung für den Aufbau des Testsystems geeignet ist.

Es wurden Platten mit absteigender Konzentration des CL18 (FYN193M CL18) Antikörpers beschichtet. Begonnen wurde mit 4 µg/mL und bis zu einer Konzentration von 0,06 µg/mL heruntertitriert. Eine Beschichtungskonzentration von 4 µg/mL zeigt im niedrigen Bereich keine ausreichende Differenzierung der Standardpunkte, um eine sensitive Messung zu ermöglichen. Erst wenn die Beschichtungskonzentration reduziert wird, zeigt sich ein zunehmender Abstand zwischen dem 0 Standard und der niedrigsten Konzentration.

Ab einer Konzentration von 0,25 µg/mL auf der Platte ist die Bindungskapazität zu gering, um höhere Konzentrationen abzubilden (Abbildung 32/

Tabelle 27).

Abbildung 32: Einfluss der Konzentration des Beschichtungsantikörpers auf die Standardkurve. Als Konjugat wurde Linezolid-HRP in einer Verdünnung von 1:170.000 (5,8 ng/mL) in Stabilzyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O eingesetzt.

Tabelle 27: Einfluss der Konzentration des Beschichtungsantikörpers auf die Ratios (%) der Standardkurve.

Beschichtungskonzentration (µg/mL)	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	0,25 µg/mL
Konzentration Linezolid (ng/mL)	OD 450/630 nm			
0	2,54	2,64	1,79	0,36
9,4	2,54	2,36	0,95	0,12
150	0,53	0,26	0,10	0,03

Die Plattenbeschichtungskonzentration von 1 µg/ml ist optimal. Es wird mit der Austestung der Konjugatkonzentration fortgefahren. Sowohl die erreichte OD<sub>max</sub> als auch die Sensitivität des Assays sind so gut eingestellt. Dafür wird die mit 1 µg/mL beschichtete Platte mit einer Standardkurve aus freiem Linezolid gemessen.

Für die Einstellung des Konjugates wird eine OD von 2,0 angestrebt. Diese ist im mittleren Messbereich der Photometer angesetzt, um die optimale Messung zu garantieren.

Die Konjugat Titration zeigte, dass erst ab einer Konzentration von unter 20 µg/mL eine Messung von niedrigen Konzentrationen des freien Linezolid möglich ist. Eine Abnahme der OD durch die

Kompetition mit dem freien Linezolid ist bei einer Konjugatkonzentration von 66 ng/mL erst ab 75 ng/mL festzustellen. Bei einer Konjugatkonzentration von 6 ng/mL ist diese schon ab 0,6 ng/mL festzustellen. Die Konjugatkonzentration hat somit einen großen Anteil, um die Sensitivität zu erhöhen. Da die maximale OD des Tests bei etwa 2 OD liegen soll, wird eine Konzentration von 6 ng/mL als optimal angesehen und im Weiteren verwendet.

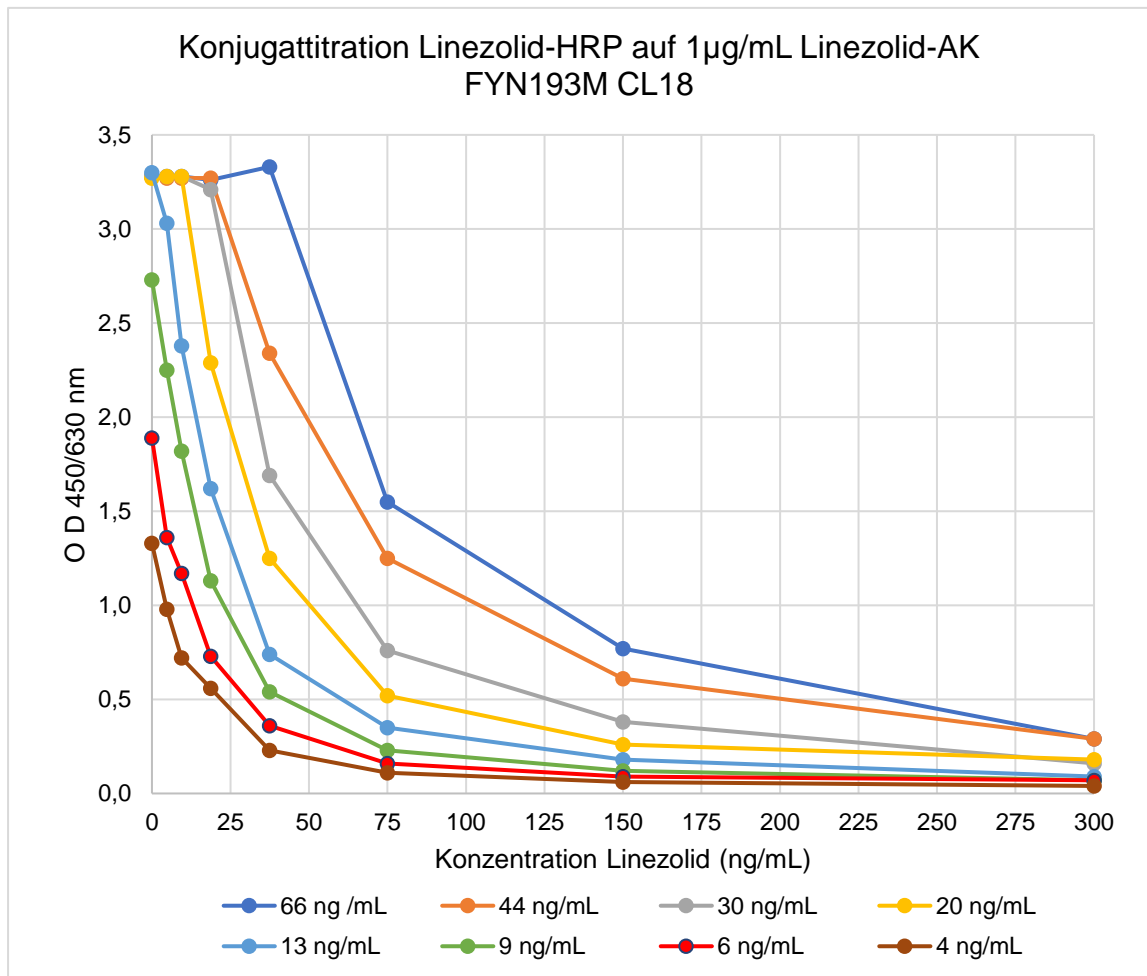


Abbildung 33: Konjugattitration Linezolid-HRP auf einer MTPL mit 1 µg/mL Linezolid Antikörper CL18 beschichtet.

Die Optimierung des Antibiotikum-HRP-Formats ist abgeschlossen.

Die Vorversuche des Ceftazidim Assays haben gezeigt, dass die Antibiotika in Lösung tendenziell ein höheres Risiko des Abbaus zeigen. Um beide Formate nutzen zu können, wird mit der Optimierung des Antikörper-HRP Formats fortgefahren, bevor die Prüfung der Einzelkomponenten erfolgt.

#### 5.4.2.2 Testsystem 2: Antikörper-HRP- Konjugat Format-

Zur Prüfung, ob dieses Testsystem für die Etablierung eines Linezolid Elisass geeignet ist, wird die Mikrotiterplatte mit einem an BSA gekoppelten Linezolid beschichtet. Die Beschichtung erfolgt zunächst von 4 bis 0,5 µg/mL.

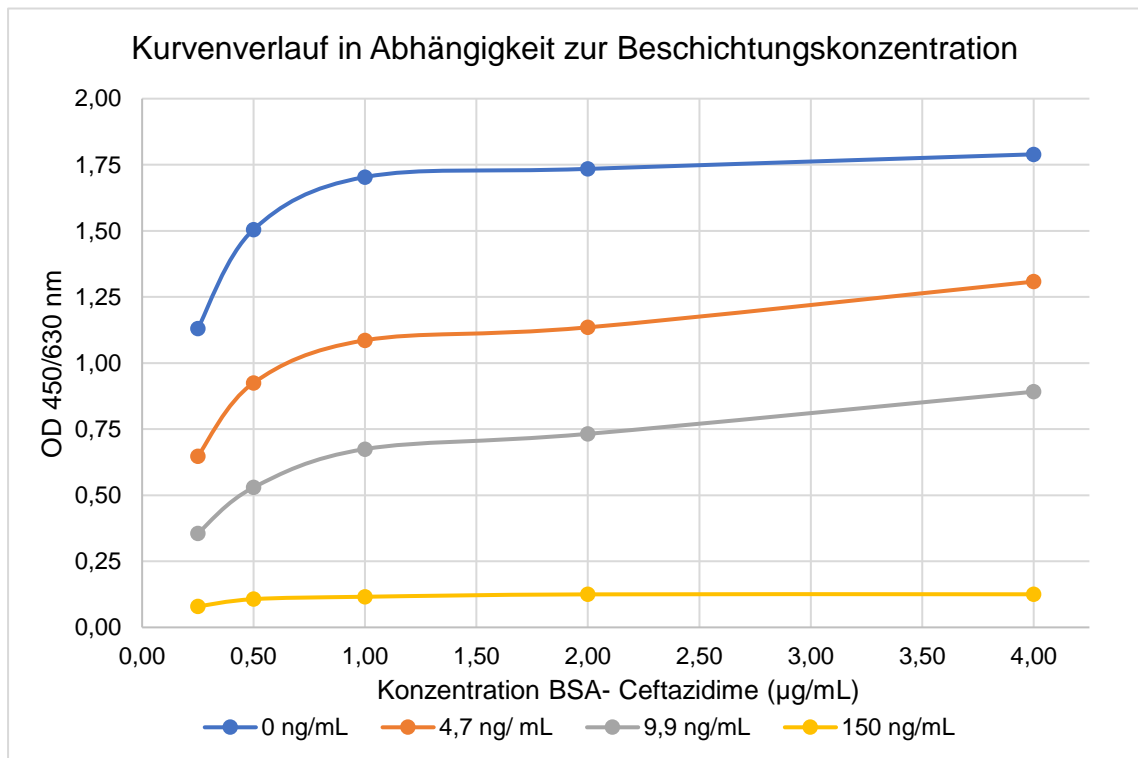


Abbildung 34: Kurvenverlauf der Standardkurve von Linezolid in Abhängigkeit von der Beschichtungskonzentration mit BSA-Linezolid. Als Konjugat wurde CL18-HRP (20 ng/mL) verwendet.

Die Beschichtungskonzentration hat einen Einfluss auf die Kurvenform. Die  $OD_{max}$  erreicht auch bei 4 µg/mL Linezolid- BSA noch kein Plateau. Es ist eine Kompetition schon in den niedrigen Konzentrationsbereichen sichtbar. Die Ratios der Kurve sinken mit einer sinkenden Beschichtungskonzentration. Die Kurve wird steiler, je weniger Linezolid-BSA auf der MTPL gebunden ist (Abbildung 35).

Die Präzision ist bei allen Beschichtungskonzentrationen zufriedenstellend (<5 %).

Allerdings zeigt die Beschichtung mit 1 µg/mL die beste Präzision mit einem Variationskoeffizienten von 1,53 %. Die Beschichtung mit 1 µg/mL kann somit beibehalten werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei einer Beschichtung von 1 µg/mL die Präzision in Abhängigkeit des pH-Werts variiert. Die Kurven werden mit zunehmenden pH-Wert steiler. Die  $OD_{max}$  ist in allen Ansätzen aber vergleichbar (Abbildung 34). Die Beschichtung kann im Folgenden mit PBS durchgeführt werden.



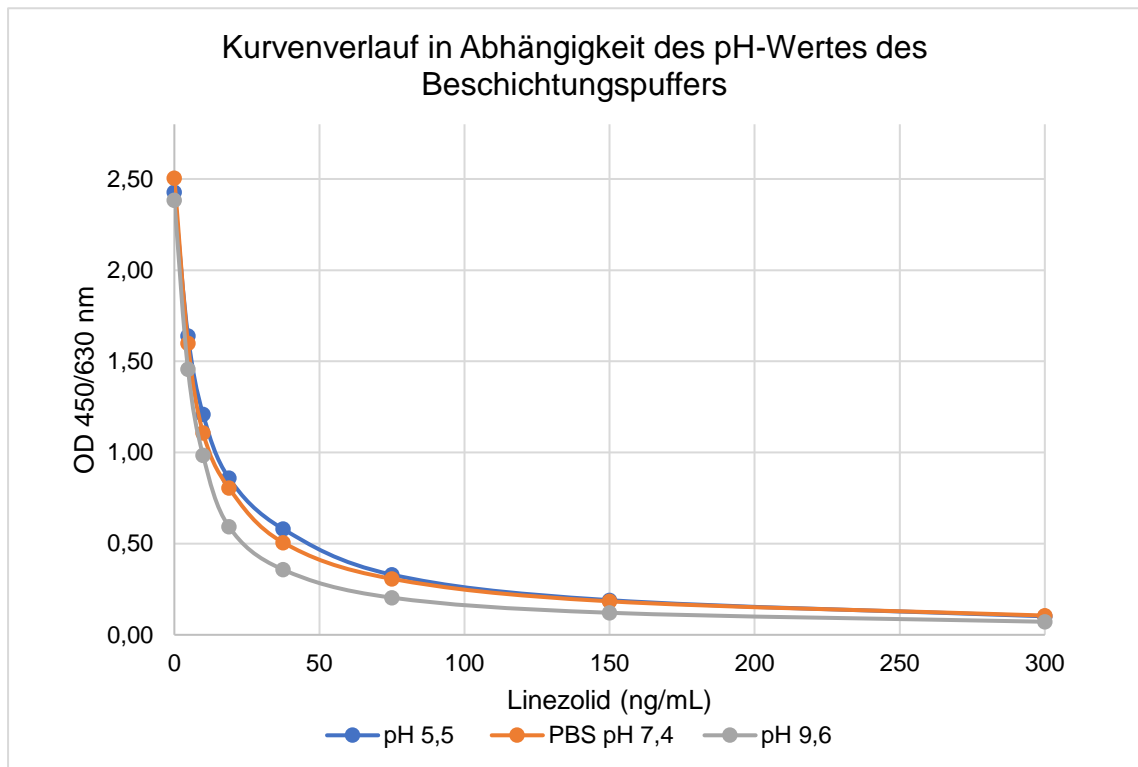


Abbildung 35: Kurvenverlauf in Abhängigkeit des pH- Werts des Beschichtungspuffers. Gezeigt ist die Beschichtung mit 1 µg/mL in Puffern mit pH-Werten von 5,5 – 9,6. Als Konjugat wurde CL18 HRP (20ng/mL) verwendet

Die Arbeitskonzentration des Konjugates wurde ebenfalls austitriert. Es wurden Konzentrationen von 5-1000 ng/mL des anti-Linezolid Klon CL18-HRP in Stabilzyme-HRP 1:2 in H<sub>2</sub>O eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine zu hohe Konjugatkonzentration zu einem Verlust der Sensitivität führt und niedrige Konzentrationen nicht mehr adäquat ermittelt werden können. Beispielsweise wird erst ab einer Konjugatkonzentration von 200 ng/mL eine Messung des 1. Standards bei 5 ng/mL möglich. Ab einer Konjugatkonzentration von  $\leq 85$  ng/mL ist die Sensitivität des Tests gegeben, um niedrige Konzentrationen zu messen.

Die optimale OD erreicht man mit ca. 20 ng/mL. Durch die großen Abstände der Standardpunkte im niedrigen Konzentrationsbereich wird ersichtlich, dass diese Konjugatkonzentration geeignet ist, um niedrig konzentrierte Proben mit hoher Akkuratheit zu bestimmen aber auch einen ausreichend großen Messbereich abzudecken, ohne schlechte VK im hohen Konzentrationsbereich zu riskieren.

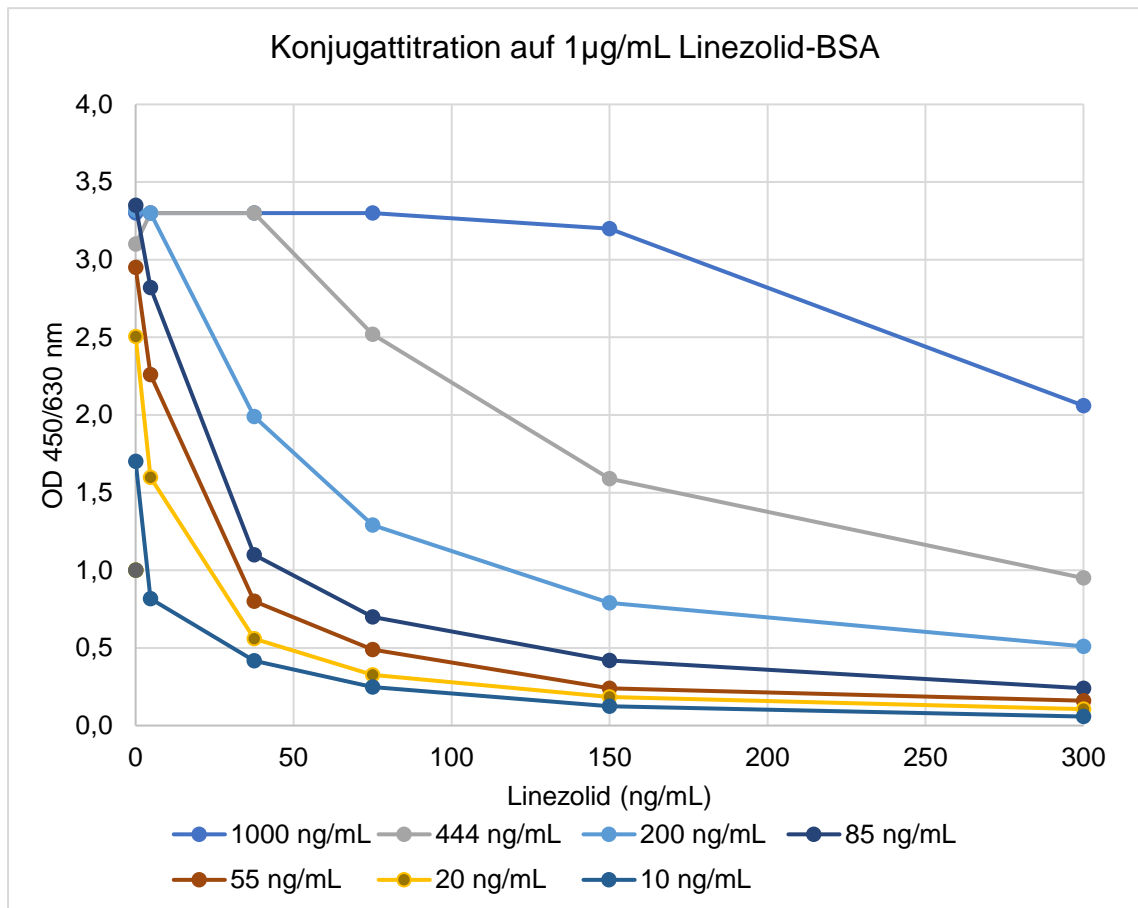


Abbildung 36: Konjugattitration auf der mit 1 µg/mL Linezolid-BSA beschichteten Platte. Titriert wurde von 1000 ng/mL- 5 ng/mL.

#### 5.4.2.3 Stabilitätsprüfung der Einzelkomponenten

##### 5.4.2.3.1 Stabilitätsprüfung Konjugat anti- Linezolid HRP

Für die Stabilitätsprüfung des Konjugates in verschiedenen Puffern wurde nach drei Tagen Lagerung bei 40 °C die erste Messung der Konjugate durchgeführt. Diese Messung wurde nach 12 Tagen wiederholt.

Eine Lagerung des Konjugats für 12 Tage bei 4 °C hat keinen negativen Einfluss auf die Stabilität. Alle drei Puffer zeigen eine Wiederfindung im Vergleich zu Tag 0 die größer als 90 %. Auch die gestressten Konjugate zeigen eine gute Vergleichbarkeit zu Tag 0 und auch zu der 4 °C Messung am selben Tag. Das Konjugat in Stabilzyme HRP zeigt noch 96 % der OD im Vergleich zu Tag 0, das Konjugat in Tracer HRP Stabilizer zeigt im Vergleich zu Tag 0 tendenziell höhere Werte. Diese Abweichung hält sich aber im Rahmen des angesetzten Akzeptanzkriterium von 15 % und ist im Mittelwert (MW) 12 % höher als der Ausgangswert. Dies kann auch auf eine Messungenaugigkeit an diesem Tag zurückzuführen sein. Das Konjugat im HRP Protector zeigt an Tag 12 eine niedrigere OD.

Im Durchschnitt ist die OD der Messung mit dem bei 40°C gelagerten Konjugat bei 91 % des Ausgangswert, also 9 % niedriger als an Tag 0 (Tabelle 28). Der Abbau im Stabilzyme HRP Puffer und dem HRP Protector Puffer ist innerhalb der gewählten Akzeptanzkriterien zu finden. Die

Ergebnisse des Tracer HRP Stabilizers sind für die Messung des bei 4 °C gelagerten Konjugats noch im Akzeptanzkriterium, allerdings weicht das gestresste Konjugat mit 16 % zu stark vom erwarteten Wert ab.

Zusätzlich fällt allerdings auf, dass die Kurvenverläufe durch die Wahl verschiedener Konjugatpuffer deutlich beeinflusst werden. Das Konjugat in Stabilzyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O zeigt eine steile Kurve (Tabelle 29). Es ist zu sehen, dass der Abstand des Nullstandards zum ersten Standard mit Analyt-Gehalt von 8 ng/mL deutlich größer ist als bei den beiden anderen Puffern. Dies spricht für eine hohe Sensitivität des Konjugats in diesem Konjugatpuffer. Wird das anti-Linezolid-HRP-Konjugat in einem der beiden andern Konjugatpuffern angeboten, so zeigt sich ein deutlich geringerer Abstand vom Nullstandard zum ersten Standardpunkt.

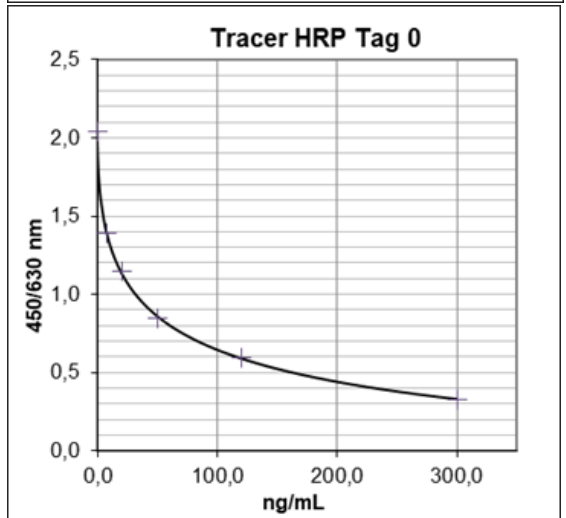
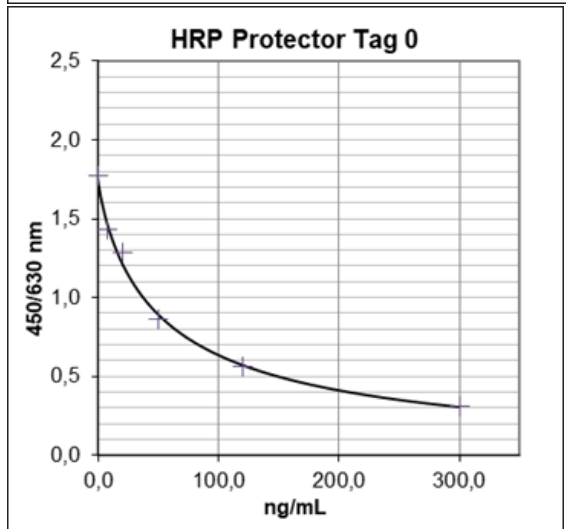
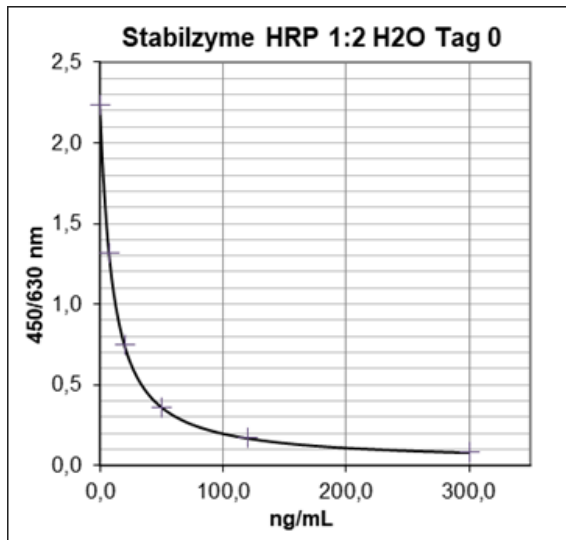
Tabelle 28: Stabilität des anti- Linezolid CL18-HRP Konjugats nach 12 Tagen bei 4°C und 40°C in verschiedenen Puffern.

	Linezolid (ng/mL)	Tag 0	Tag 12 4°C	Tag 12 40°C	Wiederfindung (%)			
					Tag 12 4°C/ Tag 0	MW	Tag 12 40°C/ Tag 0	MW
Stabilzyme HRP	0	2,24	2,39	2,41	100	96	101	93
	8	1,31	1,18	1,33	90		101	
	20	0,75	0,67	0,78	90		105	
	50	0,36	0,32	0,30	91		85	
	120	0,17	0,16	0,13	98		81	
	300	0,08	0,09	0,07	107		83	
HRP Protector	0	1,77	1,63	1,65	92	92	93	91
	8	1,43	1,30	1,29	91		90	
	20	1,28	1,11	1,18	86		92	
	50	0,86	0,86	0,85	100		98	
	120	0,56	0,50	0,56	89		99	
	300	0,31	0,28	0,23	91		73	
Tracer HRP Stabilizer	0	2,04	2,05	1,61	101	112	79	84
	8	1,39	1,76	1,33	120		96	
	20	1,15	1,32	1,07	115		93	
	50	0,84	1,09	0,77	120		92	
	120	0,59	0,78	0,44	131		75	
	300	0,33	0,28	0,23	86		72	

Auffällig ist auch, dass der höchste Standard noch eine deutlich höhere OD hat. Diese entspricht in beiden Fällen noch 18 % bzw. 16% der maximalen OD (OD S<sub>0</sub>) (Tabelle 29). Dies lässt den Schluss zu, dass die Konkurrenz in diesen beiden Konjugatpuffern deutlich ineffizienter abläuft als im Stabilzyme Puffer.

Um einen Test mit möglichst hoher Sensitivität zu entwickeln, scheint der Stabilzyme- HRP Konjugatpuffer am besten geeignet.

Tabelle 29: Einfluss des Konjugatpuffers auf den Kurvenverlauf. Gezeigt sind die Puffer Stabilzyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O, HRP Protector und Tracer HRP Stabilizer. Die Konjugatkonzentration war in allen Fällen 30 ng/mL.



OD mean	Ratio (%)
2,24	100
1,31	57
0,75	29
0,36	11
0,17	6
0,08	3
OD mean	Ratio (%)
1,77	100
1,43	81
1,28	72
0,86	49
0,56	32
0,31	18
OD mean	Ratio (%)
2,04	100
1,39	68
1,15	56
0,84	41
0,59	29
0,33	16

### 5.4.2.3.2 Stabilitätsprüfung Standardmaterial

Das Standardmaterial wurde in 25 mM Phosphatpuffer aufgenommen und eine Standardreihe durch rechnerische Verdünnung hergestellt.

Das Material wurde an Tag 0 gemessen und dann für sieben Tage bei 40 °C gelagert. Nach der Lagerung bei 40 °C für sieben Tage war kein Abbau festzustellen. Die Wiederfindung zu Tag 0 lag im Mittelwert bei 101 %. Es konnte in diesem Puffer kein Abbau festgestellt werden. Somit kann dieser beibehalten werden.

Dies deckt sich mit denen in der Literatur zu findenden Aussagen über die Stabilität des Linezolid. In Proben konnte die Haltbarkeit des Analyts sowohl bei Raumtemperatur als auch bei -20 °C und der Lagerung bei 4 °C für sieben Tage bestätigt werden (Zander et al., 2016). Des Weiteren konnte die Stabilität über sechs Wochen bei 37 °C bestätigt werden (E. Samara et al., 2017).

Die Vorversuche für die Etablierung des Testformats und der Reagenzien ist somit abgeschlossen. Der Antikörper Klon CL18 wurde HRP-konjugiert und wird im Stabilzyme HRP Puffer 1:2 H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 35 ng/mL eingesetzt. Die Plattenbeschichtung erfolgt bei über Nacht bei 4 °C mit 1 µg/mL BSA-Linezolid in PBS.

Das Standardmaterial zeigt keinerlei Stabilitätsprobleme und wird in 25 mM Phosphatpuffer eingesetzt.

## 5.5 Transfer des manuellen Protokolls auf den Vollautomaten

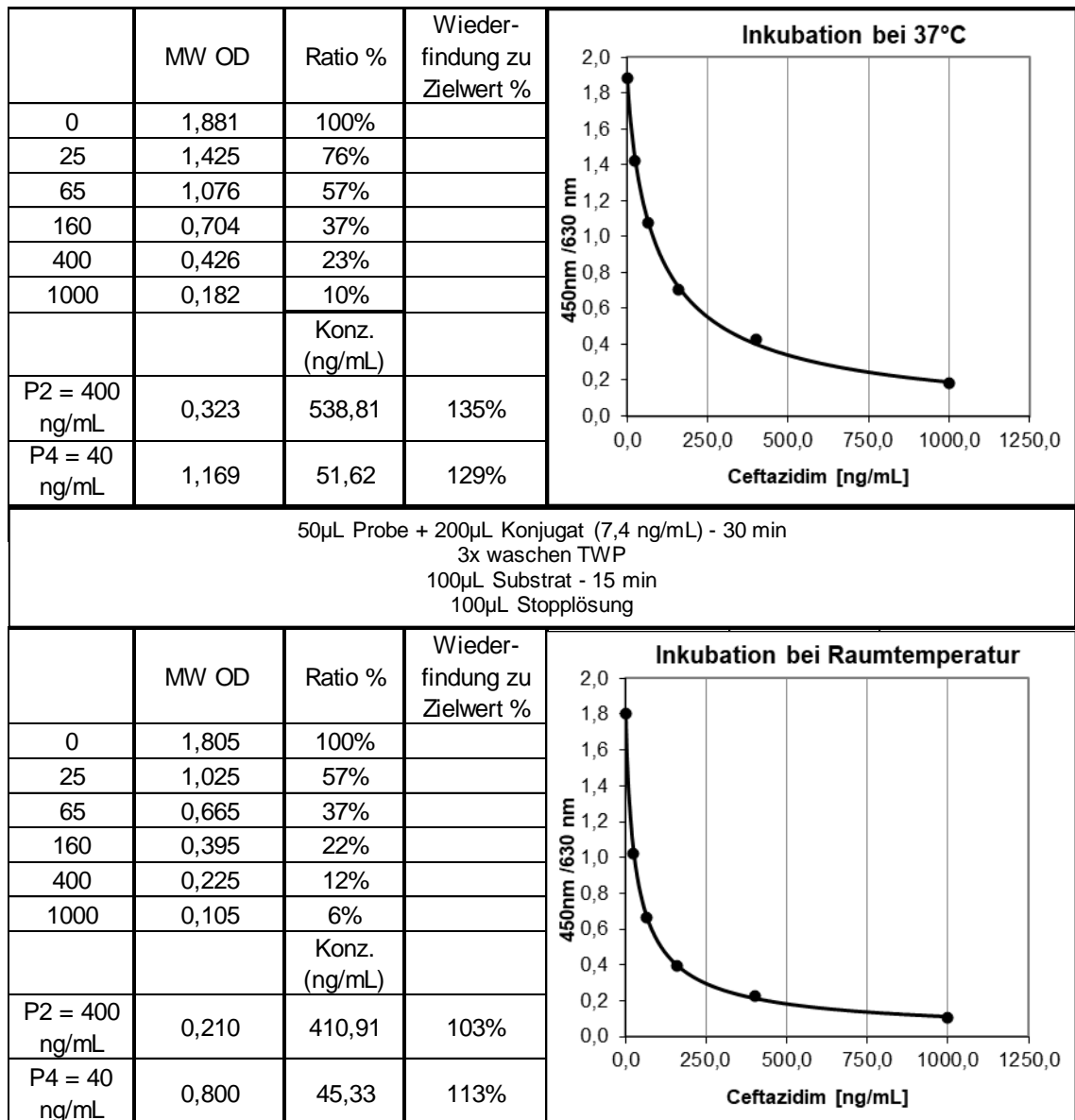
### DRG:HYBRiD-XL (Adaptierung)

Der Vollautomat DRG:HYBRiD-XL arbeitet bei einer kontrollierten Temperatur von 37 °C. Deswegen ist es unerlässlich, die Reaktion des Reagenzien auf die erhöhte Temperatur zu prüfen. Dabei wird zunächst das Testprotokoll beibehalten und lediglich die Inkubation bei 37 °C in Inkubator durchgeführt.

#### 5.5.1 Adaptierung des Ceftazidim ELISAs

Die Abarbeitung des manuellen Ceftazidim ELISAs zeigte, dass eine Anhebung der Inkubationstemperatur auf 37 °C eine Veränderung der Kurve verursacht. Die Maximale OD unterscheidet sich nur minimal, es fällt aber auf, dass die Sensitivität abnimmt und die Kurve flacher wird. Eine Konzentration von 25 ng/mL zeigt bei 37 °C einen OD-Abstand von etwa 25 % zu dem Nullstandard, bei einer Inkubation bei Raumtemperatur (RT) sieht man hier eine OD-Abnahme von über 40 % (Tabelle 30). Dieser Versuch konnte bestätigen, dass der Test einer Inkubation bei 37°C standhält. Für eine weitere Optimierung wurden nun Cartridges abgefüllt und die weiteren Messungen nur noch auf dem Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL durchgeführt.

Tabelle 30:: Vergleichende Darstellung der Standardkurven und der Kurvenspezifikationen bei Änderung der Inkubationstemperatur von Raumtemperatur auf 37°C. Die Messung erfolge bei 450nm.



Eine exakt äquivalente Abarbeitung des Assays ist auf dem Vollautomaten nicht möglich. Das Probenvolumen und der Vorverdünnungsfaktor der Probe können beibehalten werden. Durch die erhöhte Inkubationstemperatur ist eine Verschiebung der Kurve in höhere OD-Bereiche festzustellen. Somit kommt es zu einer höheren Messung der Proben. Durch eine Verstärkung der Standardkurve kann dem entgegengewirkt werden. Des Weiteren kann auch eine Anpassung der Konjugatverdünnung zu dieser Veränderung beitragen.

Allerdings sind die Zeitintervalle aufgrund der geräteeigenen Scheduler, der den Zeitplan für die Abarbeitung verschiedener Proben und Tests auf dem Gerät arrangiert, auf 30 min Intervalle festgelegt. Dies muss berücksichtigt werden. So ändert sich die Konjugatinkubation zwar nicht, aber die Substratinkubation wird von 15 min auf 30 verlängert. Das Substratvolumen muss von 100 µL auf 200 µL angehoben werden, da ein Volumen von 150 µL benötigt wird, dass für die

Messung aus dem Well in die Küvette transferiert wird. Die restlichen 50 µL verbleiben als Totvolumen im Well, um die Pipettierpräzision zu gewährleisten. Die erste Messung auf dem Vollautomaten zeigt, dass die OD durch die Messung bei 645 nm/ 450 nm (blau) deutlich höher ist. Eine OD<sub>max</sub> von 5,39 ist höher als das zulässige Akzeptanzkriterium (5,2) und muss durch eine stärkere Verdünnung des Konjugats nach unten korrigiert werden.

Die Kurve erscheint im Vergleich zu der Messung bei 37 °C im manuellen Format flacher, sodass wir einen Hintergrund von immer noch 13,2 % der OD<sub>max</sub> haben.

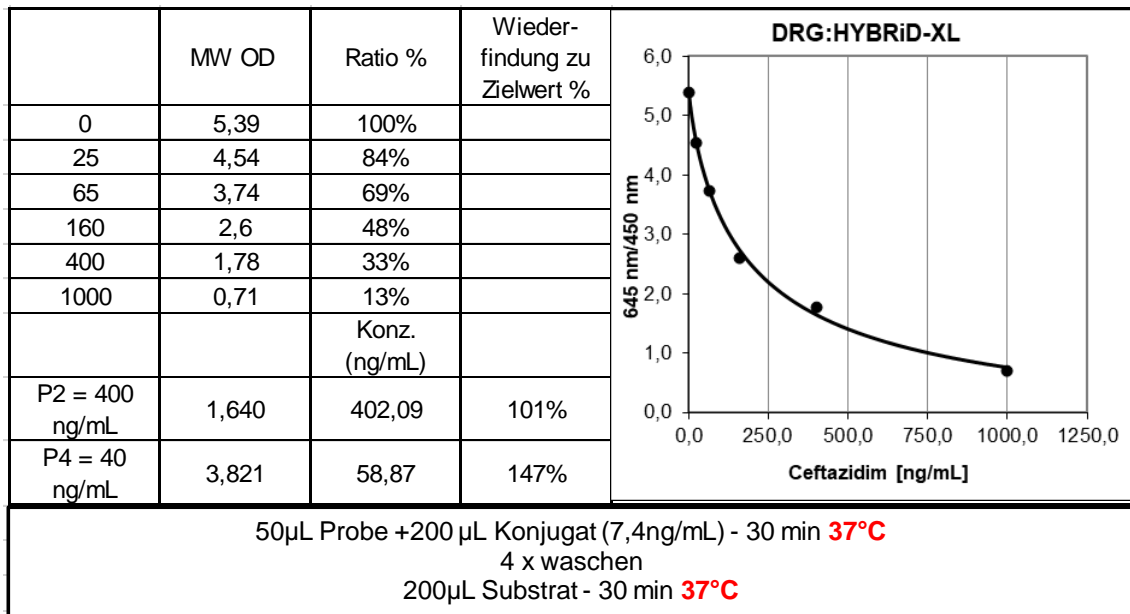


Abbildung 37: Standardkurve des Ceftazidim Assays auf dem Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL mit den Kurvenspezifikationen.

Die Vorversuche zeigten, dass sich über die Konjugatverdünnung die OD<sub>max</sub> des Tests gut kontrollieren lässt. Daher wurde die Verdünnung auf 1:25.000 angehoben. Dies entspricht einer Konzentration von 4,7 ng/mL.

So lässt sich die OD in den gewünschten Bereich korrigieren und liegt nun bei 4,90.

Um die Kurvenform zu optimieren, wurden die Reagenzienvolumina variiert.

Es ist zu erkennen, dass bei einem Probenvolumen von 25 µL selbst eine Erhöhung des Konjugatvolumens nicht zu einer verbesserten Differenzierung führt (

Abbildung 38). Der Standard 1 ist auch mit Verdopplung des Konjugatvolumens (200 µL) bei 95 % des Standards 0. Bei einem Probenvolumen von 50 µL zeigt sich allerdings eine deutliche Veränderung in der Differenzierung. Werden 50 µL Probe eingesetzt, so erhält man bei einem Konjugatvolumen von 100 µL für S1 eine Differenzierung von 15%. Diese lässt sich auch mit weiterer Erhöhung des Konjugatvolumens bestätigen.

Wählt man ein Volumen von 200 µL für das Konjugat, wird die OD deutlich höher.

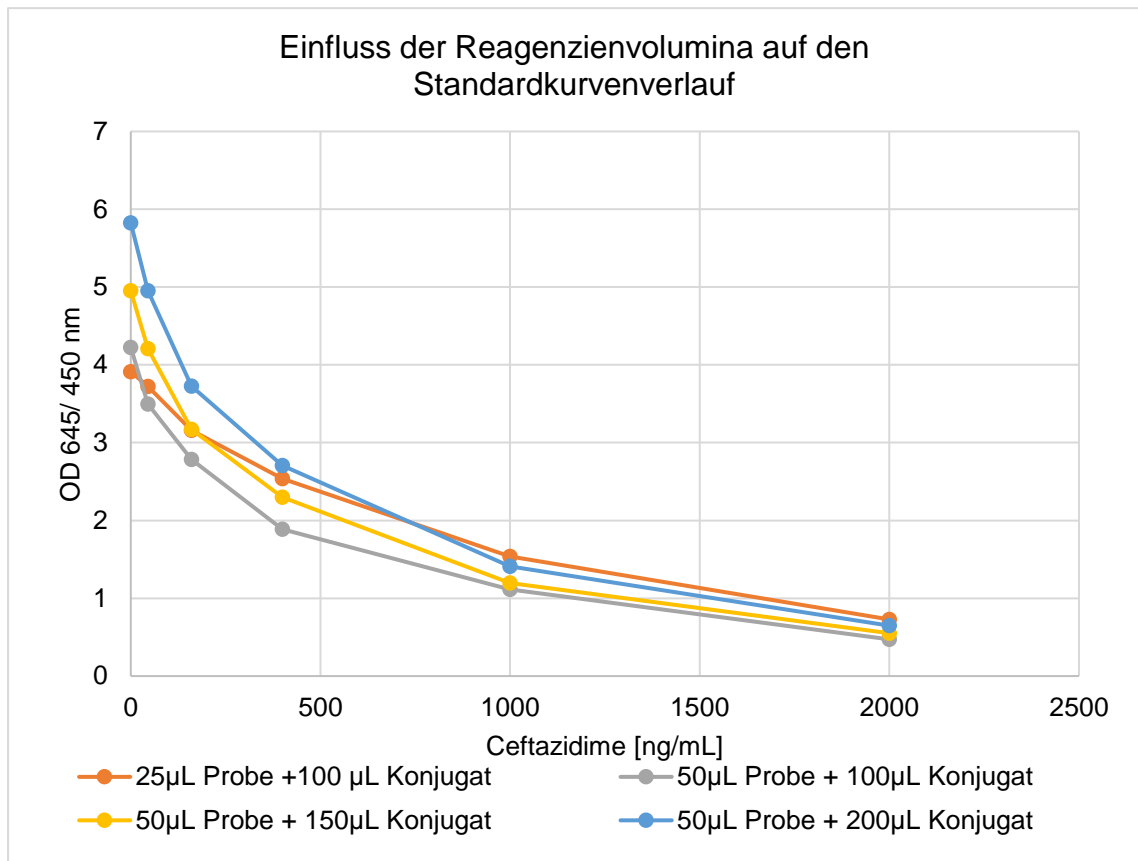


Abbildung 38: Einfluss des Proben- und Konjugatvolumens auf die Kurvenform. Das Konjugat wurde in einer Verdünnung von 1:25.000 (4,7ng/mL) eingesetzt.

Faktoren wie Richtigkeit und Testdauer müssen zusätzlich auch geprüft werden. Dafür werden im Folgenden zwei Testkonfigurationen berücksichtigt. Konfiguration-1 entspricht einem Probenvolumen von 50 µL und einem Konjugatvolumen von 100 µL. Konfiguration-2 verwendet auch 50 µL Probenvolumen, zusätzlich aber 200 µL Konjugat. Das Substratvolumen bleibt für beide Konfigurationen bei 200 µL.

#### Präzision

Zunächst wurde die Präzision der beiden Konfigurationen geprüft. Dafür wurde eine Probe im mittleren Konzentrationsbereich (250 ng/mL) verwendet und 14-fach gemessen. Die Konfiguration-1 zeigt einen CV% der Messung von 7,35 %, die Konfiguration-2 entgegen einer Variation von 13,00 %. Da bei beiden Versuchen dieselbe Platte genutzt wurde ist auszuschließen, dass die Präzision der Platte hier Einfluss nimmt. Vielmehr scheint es, dass die Erhöhung des Gesamtvolumens im Well bei einer Beschichtung mit 100 µL zu einer schlechten Durchmischung führt.

#### Probenmessung

Des Weiteren wurde geprüft, ob Proben mit definierten Konzentrationen (EUREKA-Kit) richtig bestimmt werden. Die Messung der Proben mit Konfiguration-1 zeigte eine Wiederfindung der Proben von 109 % bis zu einer niedrigsten Konzentration von 25,5 ng/mL. Die niedrigste Probe,



die bei 5,2 ng/mL liegen soll, wird nur mit 42 % wiedergefunden und bei 5,20 ng/mL gemessen. Mit der Konfiguration-2 liegen die Werte bis 25,5 ng/mL im Mittelwert bei einer Wiederfindung von 94,8 %. Auch hier zeigt sich die niedrigste Probe als nicht richtig zu bestimmen. Allerdings liegt sie hier bei 173 % im Vergleich zum Zielwert und somit beinahe doppelt so hoch bei 21,57 ng/mL gemessen.

Diese Messung zeigt, dass ab dem 1. Standard kein großer Einfluss auf die Messung wirkt, wenn das Konjugatvolumen erhöht wird. Da die maximale OD der Standardkurve allerdings deutlich höher wird, wenn das Konjugat erhöht wird, verschiebt sich der Abstand der S0 zu S1, somit wird die Probenmessung in diesem Bereich nicht zuverlässig.

Tabelle 31: Messung der EUREKA Kit Kontrollen mit Konfiguration 1 und 2.

EUREKA KIT	Zielwert	Konfiguration 1		Wiederfindung (%)	Konfiguration 2		Wiederfindung (%)
		OD	Konz. ng/mL		OD	Konz. ng/mL	
Level 1	380	1,35	394,90	104%	1,68	387,33	102%
Level 2	118	2,69	117,37	99%	3,23	116,68	99%
Level 3	25,5	3,97	29,80	117%	4,95	25,11	98%
Level 4	62	3,21	72,76	117%	4,11	58,22	94%
Level 5	12,5	4,64	5,20	42%	5,07	21,57	173%

### Inkubationszeit

Mit beiden Konfigurationen wurde auch die Inkubationszeit der Probe und des Konjugats geprüft. Hier zeigt sich in beiden Konfigurationen eine deutliche Erhöhung der OD<sub>max</sub>. Sie liegt in beiden Konfigurationen im nicht mehr messbaren Bereich für das Gerät. Allerdings zeigte sich für Konfiguration 1 eine bessere Wiederfindung der Proben, wenn die Inkubationszeit verlängert wurde. Der Versuch für Konfiguration-1 wurde erneut mit einem stärker verdünnten Konjugat durchgeführt. Bei einer Konjugatverdünnung von 1:30.800 (3,9 ng/mL) liegt die OD<sub>max</sub> jetzt im messbaren Bereich (5,63 OD). Die Wiederfindung der Proben liegt nun bei 114,4 %. Eine erneute Prüfung der Präzision zeigte, dass sich diese im mittleren Konzentrationsbereich (238,50 ng/mL) auf 5,8 % Variation verbesserte. Die niedrige Probe bei 12,20 ng/ml zeigte einen CV% von 31,1 %. Dies lässt darauf schließen, dass sich das Limit of Detection des Testformats über diesem Konzentrationsbereich befindet.

Die Konfiguration-1 zeigt in allen Versuchen Vorteile im Vergleich zu Konfiguration-2.

Sowohl die Präzision als auch die Richtigkeit von Proben mit vorgegebenen Konzentrationen sind mit diesem Format besser, sodass mit dieser Testkonfiguration weiterverfahren wird. Zusätzlich wird ein Standard 2000 ng/mL in die Kurve eingefügt, um die sichere Messung von hohen Proben zu garantieren. Der Standard mit der Konzentration 25 ng/mL wird mit 45 ng/mL ersetzt, da ein Standardpunkt mit einer Konzentration von 25 ng/mL, wenn man die Vorversuche betrachtet, zu nah an der Bestimmungsgrenze des Assays liegen würde.

Die neue Standardisierung umfasst somit die in Tabelle 32 aufgeführten Konzentrationen. Die Messung dieser Standardkurve zeigte abschließend, dass eine Inkubation von Probe und Konjugat von 30 min ausreichend ist, um eine richtige Messung der Proben zu garantieren.

Tabelle 32: Optimierte Standardisierung des Ceftazidim- Assays für den Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL .

Standard	Konzentration (ng/mL)
S0	0
S1	45
S2	160
S3	400
S4	1000
S5	2000

Der Prototyp für die Nutzung auf dem DRG:HYBRiD-XL ist somit erfolgreich adaptiert. Das Probenvolumen des Assays konnte von dem manuellen Assay beibehalten werden. Das Konjugatvolumen wurde im Vergleich zu dem manuellen Assay verringert und auch die Konzentration musste verringert werden.

Die Abarbeitung auf dem Hybrid sieht nun wie folgt aus:

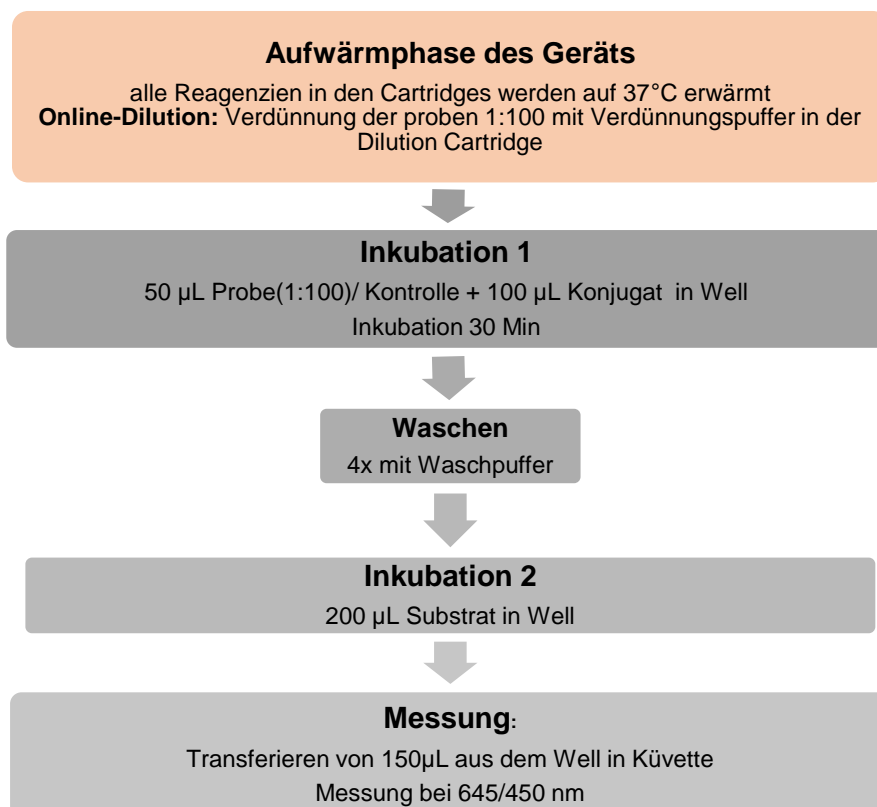


Abbildung 39: schematische Darstellung der Testabarbeitung des Ceftazidim ELISAs auf dem Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL

### 5.5.2 Adaptierung des Linezolid ELISAs

Der erste Schritt zur Adaption auf dem Vollautomaten ist die Abarbeitung des manuellen Assays bei 37 °C, um den Einfluss der erhöhten Inkubationstemperatur zu analysieren.

Die Inkubation bei 37 °C zeigte eine deutlich flachere Kurve als die bei Raumtemperatur abgearbeitete. Dies hat zur Folge, dass die 1:100 vorverdünnten Proben nicht mehr akkurat gemessen werden können.

Die Spezifikationen der Standardkurve können durch eine 10-fache Verstärkung des Standards wieder hergestellt werden. Somit werden die ersten Versuche auf dem Vollautomaten mit der verstärkten Kurve durchgeführt.

Es wurde eine Titration des Konjugats mit der neuen Standardkurve durchgeführt.

Dabei wurden Konzentrationen des Konjugat von 50 ng/mL bis 25 ng/mL in Stabilzyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O getestet (Abbildung 41). Die OD<sub>max</sub> wird mit senken der Konjugatkonzentration geringer. Wichtiger ist aber die Differenzierung der Standardkurve. Diese wird mit Abnahme der Konjugatkonzentration deutlich besser. Die Abstände zwischen S0 und S1 werden bei einer Reduzierung der Konjugatkonzentration von 50 ng/mL auf 25 ng/mL 20 % größer. Dies verbessert die Sensitivität des Assays und lässt eine differenziertere Messung im unteren Bereich der Kurve zu.

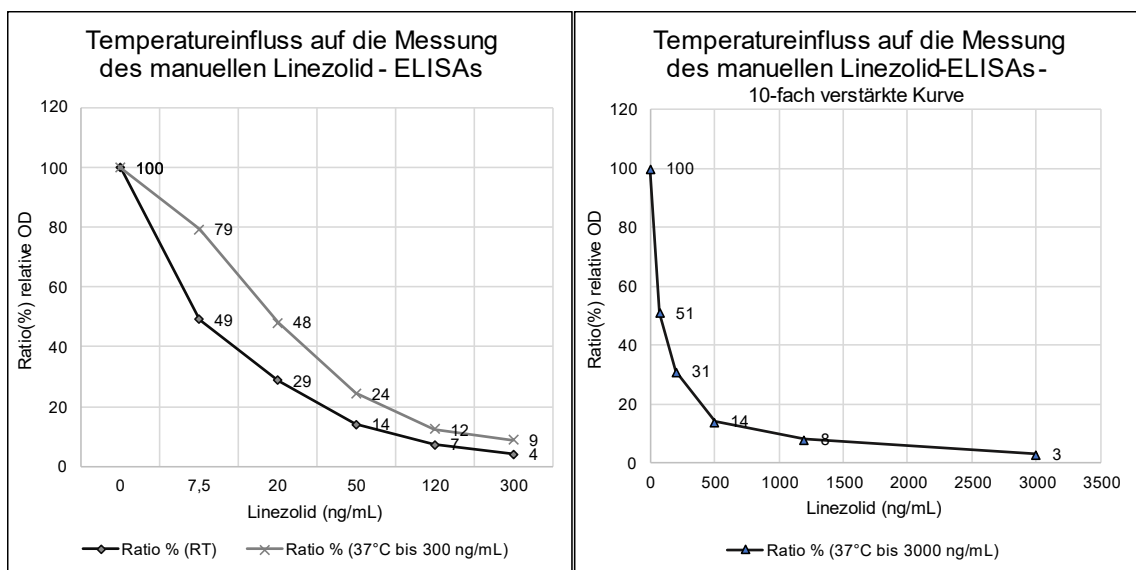


Abbildung 40: Temperatureinfluss auf die Standardkurve bei manueller Abarbeitung des ELISAs bei 37°C. Konjugatkonzentration 20 ng/mL in Stabilzyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O. links: Abarbeitung bei RT und 37°C mit Standardreihe bis 300 ng/mL. Rechts: Angleichung der Standardkurvenverhältnisse durch 10-fache Verstärkung des Standards. Datenpunkte jeweils rechts der Diagrammpunkte dargestellt.

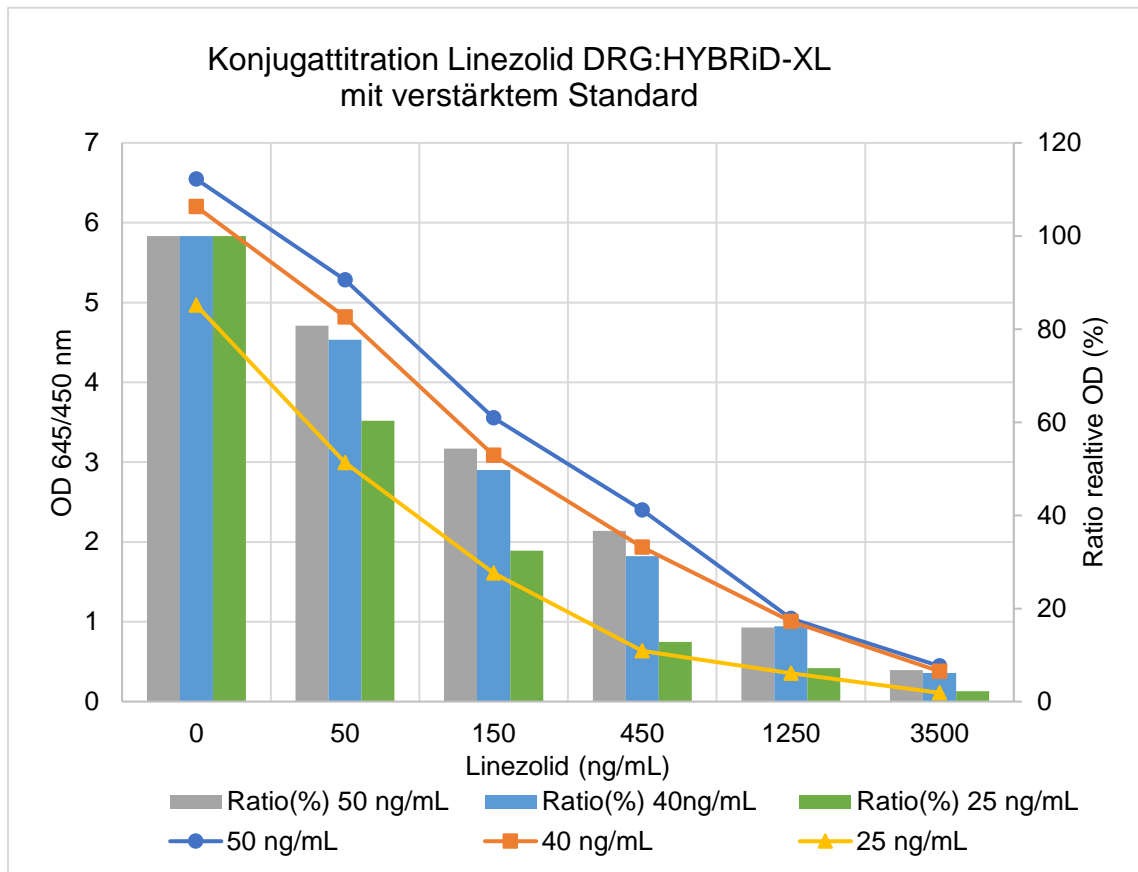


Abbildung 41: Konjugattitration von 50 ng/mL- 25 ng/mL in Stabilzyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O. Gezeigt ist die OD bei 645 nm/450 nm (Linie, Primärachse) und die relative OD in Prozent (Balken, Sekundärachse).

Der Assay wurde in allen Vorversuchen auf dem Hybrid mit 30-minütiger Inkubation von Probe und Konjugat durchgeführt. Um eventuelle Einflüsse einer längeren Inkubation von 60 min zu prüfen, wurde diese durchgeführt. Es ist außer der generellen Erhöhung der OD kein Einfluss auf die Standardkurve zu verzeichnen. Die  $OD_{max}$  steigt bei gleicher Konjugatkonzentration um 26,5 % an. Die Abbildung 41 zeigt aber, dass trotz einer Differenz der optischen Dichte als Folge der verlängerten Inkubation die Kurvenspezifikationen beibehalten werden. An dem Verlauf der Standardkurve verändert eine längere Inkubationszeit somit nichts, und die 30-minütige Inkubationszeit von Probe und Konjugat kann beibehalten werden.

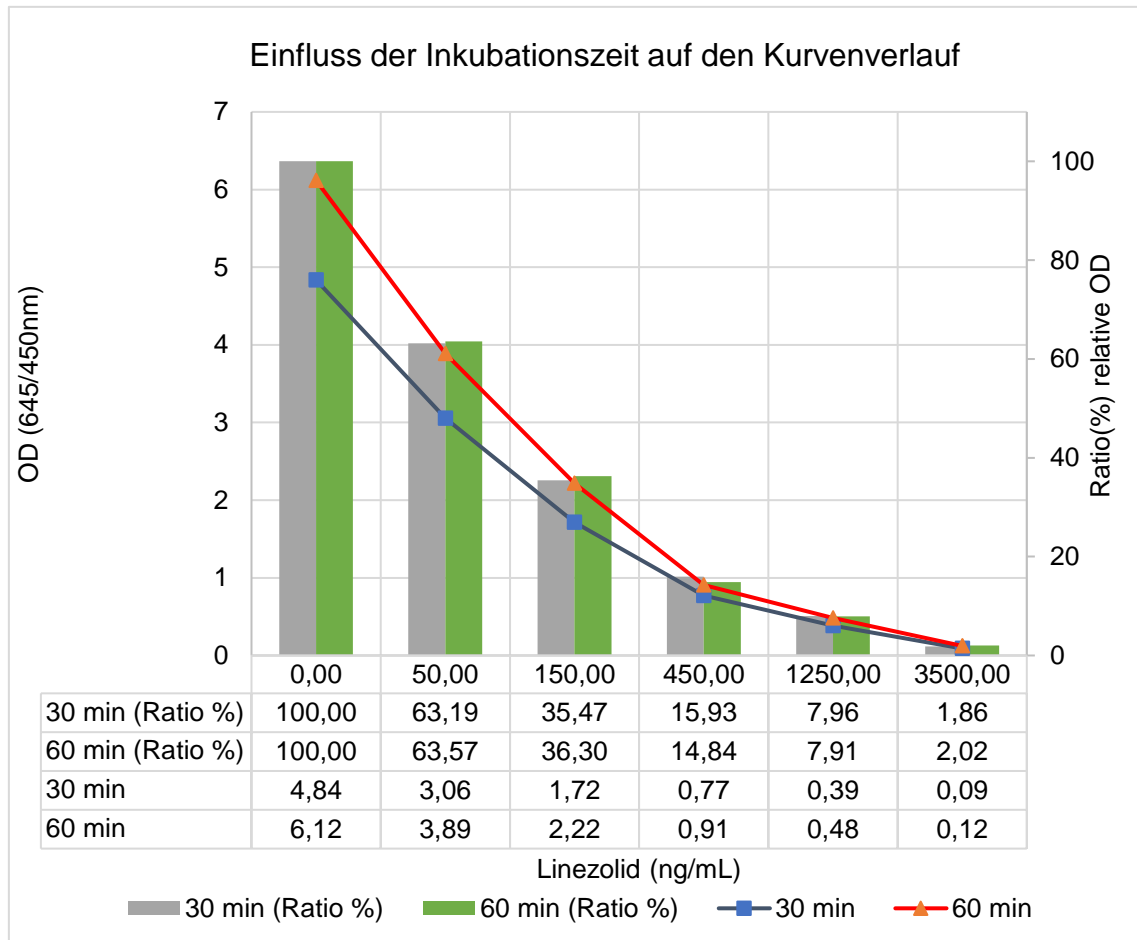


Abbildung 42: Einfluss der Inkubationszeit auf den Kurvenverlauf. Standardkurve von 0-3500 ng/mL in Phosphatpuffer pH 5,5. Konjugat 25 ng/mL in Stabilizyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O. Gezeigt ist der Kurvenverlauf (Primärachse, Linie) und die relativ OD in Prozent (Sekundärachse, Balken).

Da die Kurvenform auf dem Hybrid trotz 10-fach stärkerem Standard noch flacher erscheint und für die richtige Bestimmung der Proben ein anderer Probenverlauf nötig ist wurde geprüft, ob die Verschiebung der Standardkurve durch die Erhöhung des Probenvolumens möglich ist. Es ist zu sehen, dass eine Erhöhung des Probenvolumens eine Veränderung der Standardkurve bewirkt. Je höher das Probenvolumen ist, desto steiler wird die Kurve. Dies fällt vor allem in den niedrigen Konzentrationsbereichen auf. In jedem Versuch wurden zusätzlich auch Proben mit definiertem Zielwert mitgeführt. Die Messung mit den verschiedenen Standardkurven ergab, dass sich ein Probenvolumen von 20 µL besonders gut eignet, um eine akkurate Probenmessung zu gewährleisten. Bei einem Probenvolumen von 20 µL wird eine Wiederfindung von im Mittelwert 103 % erreicht. Reduziert man das Probenvolumen auf 10 µL, so liegt die Wiederfindung der Proben zum Zielwert durch den geänderten Kurvenverlauf bei 155 %. Eine weitere Zugabe beim Probenvolumen auf 25 µL Probe zeigt einen gegenläufigen Effekt (Abbildung 43). Die Wiederfindung der Proben liegt hier nur noch bei 80 %. Für den Assay ist ein Probenvolumen von 20 µL optimal.

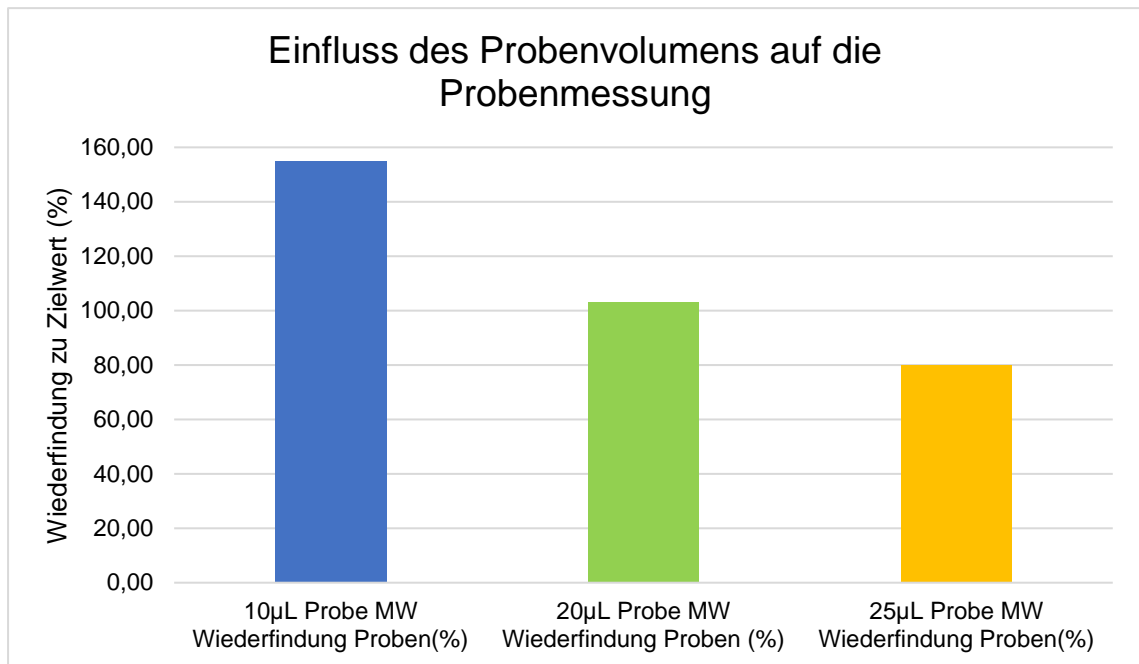


Abbildung 43: Einfluss des Probenvolumens auf die Wiederfindung der Proben im Vergleich zum Zielwert. Gezeigt sind relative ODs in % (Primärachse, Linie) und der Mittelwert (MW) der Wiederfindung zum Zielwert von sechs Proben aus dem EUREKA- Kit LC-79016. Das Konjugat wurde in einer Konzentration von 25 ng/mL in Stabilzyme HRP 1:2 H<sub>2</sub>O verwendet.

Die Abarbeitung auf dem Hybrid sieht nun wie folgt aus:

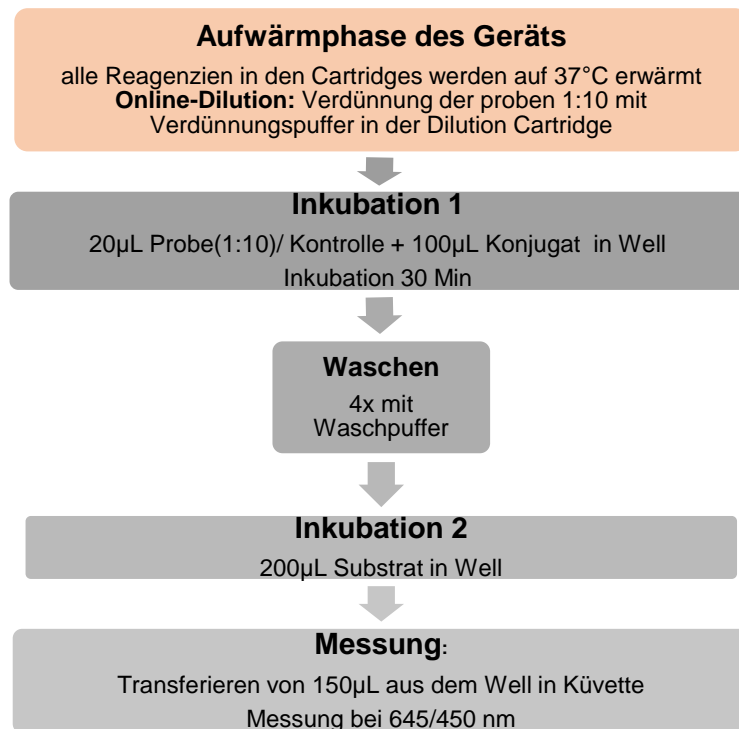


Abbildung 44: Testabarbeitung des Linezolid ELISAs auf dem Vollautomaten DRG:HYBRiD-XL

Die Optimierung und Adaptierung des Linezolid Assays ist somit abgeschlossen, alle fraglichen Parameter des Assays wurden geprüft. Es wird mit der technischen Dokumentation fortgefahren.

## 5.6 Produktion von Prototyp- Chargen

### 5.6.1 Qualitätskontrolle des 1. Funktionsmusters (Prototyp 1)

Nach erfolgreicher Optimierung der beiden Testsysteme für Linezolid und Ceftazidim auf dem Hybrid wird nun auf Grundlage der Erkenntnisse der Vorversuche der 1. Prototyp erstellt. Dafür ist es nötig als Entwicklungsverantwortlicher die Produktionsdokumente als Entwurf auszufüllen. Wichtig ist auch, dass im Vorfeld eine Qualitätskontrolle der verwendeten Materialien durchgeführt wird.

#### 5.6.1.1 Plattenhomogenität

Die Homogenität der für den Prototyp1 verwendeten Platten wurden wie in 4.2.10.2 durchgeführt. Die mit BSA-Ceftazidim beschichteten Platten der Charge 457ACW031 wurden geprüft. Dafür wurde eine Platte der Produktionsmitte genutzt. Als Probe wurde die Kontrolle zwei (C2) genutzt. Die ermittelte OD lag im Mittelwert bei 0,96. Die mittlere Standardabweichung betrug 0,05. Der höchste in der Messung gefundene Wert ergab 1,07, der Minimalwert lag bei 0,78. Insgesamt lag der Variationskoeffizient bei 5,42 %.

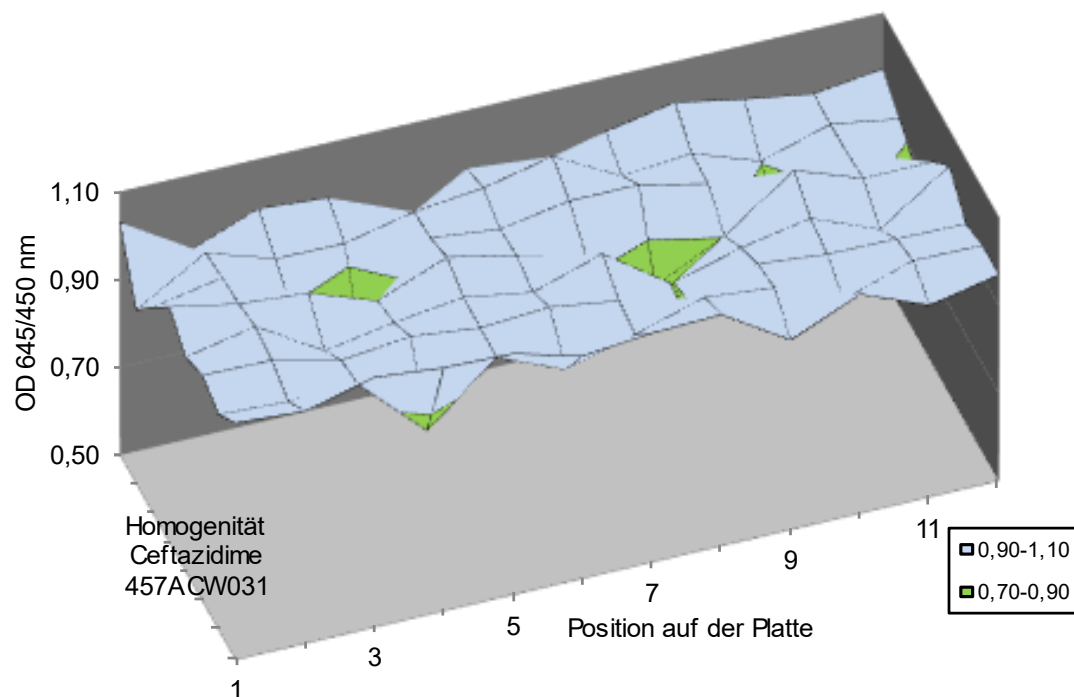


Abbildung 45: grafische Darstellung der Homogenität der im Prototyp 1 Ceftazidim verwendeten Platten der Charge 457ACW031.



Die mit BSA-Linezolid beschichteten Platten der Charge 459ACW071 wurden geprüft. Dafür wurde eine Platte der Produktionsmitte genutzt. Als Probe wurden die Kontrolle 1 und Kontrolle 2 zu gleichen Teilen gemischt. Die ermittelte OD lag im Mittelwert bei 0,80. Die mittlere Standardabweichung betrug 0,04. Der höchste in der Messung gefundene Wert ergab 0,88, der Minimalwert lag bei 0,70. Insgesamt lag der Variationskoeffizient bei 4,87 %.

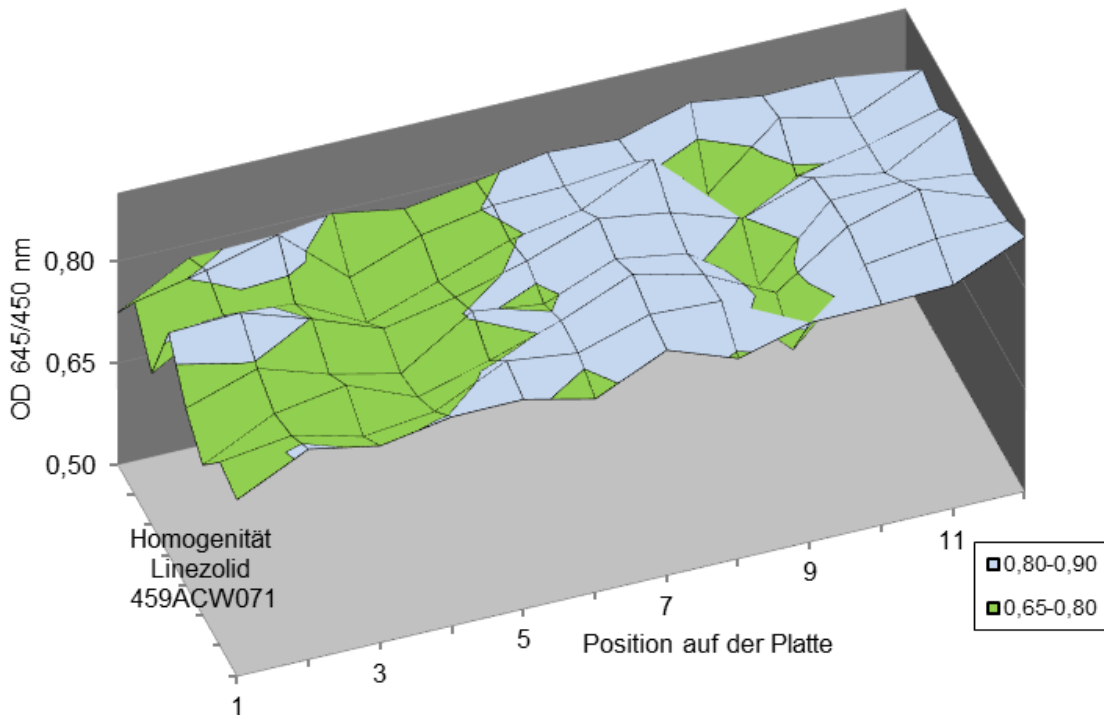


Abbildung 46: grafische Darstellung der Homogenität der im Prototyp 1 Linezolid verwendeten Platten der Charge 459ACW071.

Beide Platten erfüllen das Freigabekriterium von einem Variationskoeffizient der Messung von <7,5 % und werden für die Produktion des 1. Prototyps verwendet.

### 5.6.1.2 Erstellung der Mastercurve

Wie in 4.2.10.1 beschrieben, werden mit den maschinell abgefüllten Cartridges der hergestellten Charge die Mastercurve erstellt. Diese dient dem Gerät als Standardkurve und wird mit Hilfe von zwei Rekalibratoren und zwei Kontrollen auf das Gerät angepasst und kalibriert. Für die Erstellung der Mastercurve werden alle Standards in zwei Läufen mit je 5-facher Bestimmung gemessen. So ergibt sich ein Mittelwert aus zehn gemessenen Werten und ein Variationskoeffizient, der < 10 % sein sollte.

Die Messungen entsprachen für beide Tests den Akzeptanzkriterien. In

Abbildung 47 sind die erstellten Kurven gezeigt. Die Standardabweichung ist für jeden Messpunkt anhand der roten Fehlerbalken ersichtlich.

Im Mittelwert betrug die Standardabweichung für alle Messpunkte in der Mastercurve für den Ceftazidim Assay 0,052, für den Linezolid Test 0,053.

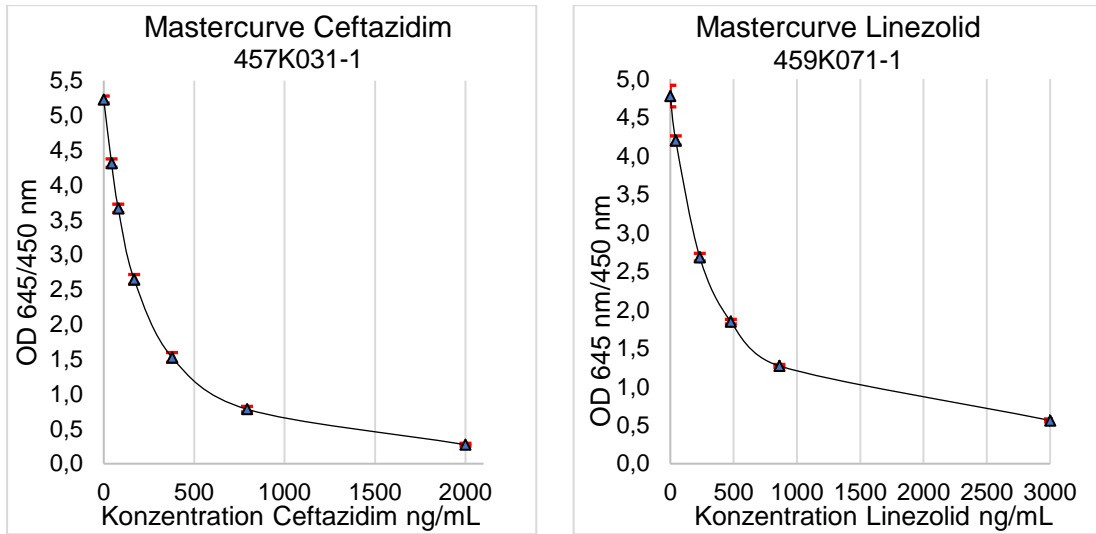


Abbildung 47: Mastercurve für Ceftazidim 457K031-1 und Linezolid 459K071-1. Fehlerindikatoren für Standardabweichungen in Rot.

5.6.1.3 Funktionelle Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle wird wie in Kapitel 4.2.10.3 beschrieben durchgeführt.

Für die Freigabe des Ceftazidim Assays werden zwei interne Kontrollen und sechs Proben gemessen. Die Probenkonzentration ist so gewählt, dass der Messbereich des Tests gut überprüft werden kann. Alle Proben werden wie erwartet gemessen, wie die Auswertung in Tabelle 33 zeigt. Die ermittelte Konzentration der Proben ist in der QC1 im Mittelwert exakt richtig, in der QC2 ergibt sich im Mittelwert eine etwas niedrigere Wiederfindung um Zielwert (97 %). Insgesamt stimmen die gefundenen Konzentrationen gut überein und erfüllen alle Akzeptanzkriterien.

Tabelle 33: Auswertung der Ergebnisse der funktionellen Qualitätskontrolle des Prototyp 1 457K031-1 für den Parameter Ceftazidim.

Probe	Zielwert	Quotient QC1 zu Zielwert %	Quotient QC2 zu Zielwert %	Quotient QC1 zu QC2 %
Kontrolle 1	80,14	0,85	0,93	0,92
Kontrolle 2	791,80	1,00	0,98	1,03
P1	910,00	1,01	0,99	1,02
P2	550,00	1,04	0,99	1,05
P3	360,00	1,00	0,96	1,04
P4	520,00	1,04	0,98	1,06

## Ergebnisse und Diskussion

P5	170,00	1,02	0,98	1,04
P6	220,00	1,01	0,92	1,10
Mittlerer Quotient:		1,00	0,97	1,03
Akzeptanzbereich		0,8 - 1,2	0,8 - 1,2	0,8 - 1,2

Für die Freigabe des Linezolid Assays werden zwei interne Kontrollen, vier klinische Proben und vier externe Kontrollen gemessen.

Die Auswertung in Tabelle 31 zeigt, dass alle Proben wie erwartet gemessen wurden. Die ermittelte Konzentration der Proben ist sowohl in QC1 als auch in der QC2 zufriedenstellend. Auch die beiden Messungen untereinander sind gut vergleichbar. Insgesamt stimmen die gefundenen Konzentrationen gut überein. Das Akzeptanzkriterium mit einem Quotienten von 0,80 bis 1,20 ist erfüllt.

Tabelle 34: Auswertung der Ergebnisse der funktionellen Qualitätskontrolle des Prototyp 1 459K071-1 für den Parameter Linezolid.

Probe	Zielwert	Quotient QC1 zu Zielwert %	Quotient QC2 zu Zielwert %	Quotient QC1 zu QC2 %
Kontrolle 1	233,43	0,99	0,93	1,06
Kontrolle 2	891,35	1,02	0,97	1,05
08-20-1007	341,20	0,93	1,23	0,76
08-29-1019	414,00	0,73	1,09	0,67
2104-20-1007	1110,00	1,51	1,81	0,84
2104-18-1004	292,00	1,24	1,17	1,06
Eureka Kit Ctrl 1	50,00	1,09	1,00	1,10
Eureka Kit Ctrl 2	500,00	0,98	0,88	1,12
Eureka Cal 5	260,00	0,99	1,02	0,97
Eureka Cal 6	1020,00	0,68	0,82	0,82
Mittlerer Quotient:		1,02	0,94	1,09
Akzeptanzbereich		0,8 - 1,2	0,8 - 1,2	0,8 - 1,2

Beide Prototypchargen erfüllen die geforderten Kriterien und können für die Überprüfung der Leistungsdaten des Tests verwendet werden.

## 5.7 Technische Dokumentation – Verifizierung

### 5.7.1 Bestimmung des Probenotyps (Sample Collection)

Für die Abarbeitung der technischen Dokumentation müssen sechs Verlaufsproben erstellt werden. Zuvor sollte aber geprüft werden, welches Ausgangsmaterial zur Verwendung geeignet ist.

Es wurden Proben von zehn Patienten verwendet, die jeweils als Serum, Citrat-Plasma, Heparin-Plasma und EDTA-Plasma vorlagen. Diese Proben beinhalteten kein Antibiotikum, deshalb musste dies durch Spiken hinzugefügt werden.

Die Ergebnisse des Versuchs für Ceftazidim mit der Lot 457K031-1 in Tabelle 35 zeigen, dass die ermittelten Werte im Serum und im Plasma übereinstimmen. So ist davon auszugehen, dass die Durchführung des Assays mit allen Arten von Serum und Plasmaproben möglich ist.

Die Akzeptanzkriterien werden beide erfüllt. Die Wiederfindung aller Plasmaarten zu der Serumprobe liegt zwischen 101,9 % und 107,1 %. Auch das zweite Akzeptanzkriterium ist zu erfüllen. Lediglich bei den zehn Heparin-Plasma Proben ist eine mit einer Wiederfindung größer als 120 % (121,2 %). Andere Proben im selben Konzentrationsbereich sind aber richtig bestimmt, sodass alle Plasmaarten für die Herstellung von Verlaufsproben für die technische Dokumentation herangezogen werden können.

Tabelle 35: Zusammenfassung der Ergebnisse der Sample Collection für den Ceftazidim Assay. Es wurden gespikete Serum und Plasmaproben gemessen. Die Wiederfindung der Plasma Proben wurde zum im Serum ermittelten Wert berechnet. Zur Messung wurde die Lot 457K031- 1 verwendet.

Sample	Serum Konzentration in ng/mL	Wiederfindung % Heparin	Wiederfindung% EDTA	Wiederfindung % Citrate
1	258,38	94,4	118,2	100,8
2	392,13	92,9	97,2	113,1
3	216,50	101,8	89,6	92,7
4	412,13	90,4	112,9	118,8
5	439,00	100,0	95,4	98,3
6	240,63	97,7	99,0	106,9
7	130,50	88,0	93,1	97,1
8	118,25	114,0	117,8	110,3
9	45,71	118,8	114,9	115,6
10	221,88	121,2	115,6	117,1
Mittelwert Wiederfindung %		101,9	105,4	107,1
Akzeptanzkriterium 1		80,0-120,0 %		
Akzeptanzkriterium 2		8 von 10 Proben erfüllen Akzeptanzkriterium 1		

Die Ergebnisse des Versuchs für Linezolid in Tabelle 36 zeigen, dass die ermittelten Werte im Serum und im Plasma übereinstimmen. So ist davon auszugehen, dass die Durchführung des Assays mit allen Arten von Serum und Plasmaproben möglich ist.

Die Akzeptanzkriterien werden beide erfüllt. Die Wiederfindung aller Plasmaarten zu der Serumprobe liegt zwischen 89,2 % und 100,4 %. Auch das zweite Akzeptanzkriterium ist zu erfüllen. Lediglich bei den zehn Citrat-Plasma Proben sind mit einer Wiederfindung kleiner als 80 % (74,1 % und 76,5 %) zu finden. Generell ist festzustellen, dass die Wiederfindung der gespikten Citrat-Plasma Proben geringer ist als die der andern Plasma Arten. Dies könnte auf einen Fehler bei der Abnahme des Plasmas hindeuten. Gerade bei der Abnahme von Citrat Plasma ist es essenziell auf die richtige Füllmenge des Abnehmeröhrchens zu achten. Das Verhältnis von Citrat zu dem abgenommenen Vollblut muss immer 1:10 ergeben (LADR, 2021). So kann schon das Totvolumen des Schlauchs zu einer Störung des Verhältnisses führen und das Blut zu sehr verdünnt durch die Citratlösung vorliegen.

Andere Proben in ähnlichem Konzentrationsbereich sind aber richtig bestimmt, sodass alle Plasmaarten für die Herstellung von Verlaufspalten für die technische Dokumentation herangezogen werden können.

Tabelle 36: Sample Collection für den Linezolid Assay. Es wurden gespikte Serum und Plasmaproben gemessen. Die Wiederfindung der Plasma Proben zu im Serum ermittelten Wert. Die grau hinterlegten Werte sind außerhalb der Akzeptanzkriterien zu finden.

Sample	Serum Konzentration in ng/mL	Wiederfindung % Heparin	Wiederfindung % EDTA	Wiederfindung % Citrat
1	601,0	102,2	88,7	74,1
2	290,0	92,4	95,2	84,8
3	174,5	106,9	119,8	96,0
4	707,0	82,9	99,3	76,5
5	193,0	93,8	107,8	90,9
6	2120,0	81,8	88,2	83,0
7	320,5	110,9	90,6	88,3
8	1815,0	97,0	86,0	112,1
9	869,0	92,6	116,3	94,6
10	219,0	114,4	111,6	91,3
Mittelwert Wiederfindung %		97,5	100,4	89,2
Akzeptanzkriterium 1		80,0-120,0 %		
Akzeptanzkriterium 2		8 von 10 Proben erfüllen Akzeptanzkriterium 1		

### 5.7.2 Bestimmung des Limit of Blanks

Dieser Versuch wurde wie unter 4.2.12.1 beschrieben durchgeführt.

Der Nullstandard wurde in 60-facher Bestimmung vermessen. Daraus wurde der LOB mit Formel 1 berechnet.



von 1:100, die in die Ermittlung der Werte mit einbezogen wird, ergibt sich somit auf der Basis des LoD eine untere Assaygrenze von 1118,00 ng/mL oder 1,12 µg/mL.

### Linezolid

Wie beim Ceftazidim Assay soll auch hier die erste Probe die Hälfte der Konzentration des 1. Standards beinhalten. Der Standard 1 des Linezolid Assays hat eine Konzentration von 50 ng/mL. Es wird eine Probe mit der Konzentration von 25 ng/mL hergestellt.

Die 60-fach Bestimmung dieser Probe auf dem Vollautomaten ergab einen Mittelwert von 21,61 ng/mL. Die Standardabweichung der Messung wurde mit 3,32 berechnet.

Der Variationskoeffizient der Messung war 15,4 %. Da dieser Wert noch nicht die 20 % erreicht hat, wird eine weitere Probe hergestellt. Da mit 15,4 % schon ein hoher VK erzielt wurde, wurde diesmal nur eine Verdünnung von 1:1,2 hergestellt, diese sollte rechnerisch 17,5 ng/mL entsprechen. Die Messung der Probe ergab eine Konzentration von 16,98 ng/mL. Die Standardabweichung lag bei 3,03 und der VK bei 17,8 %.

Um die 20 % zu überschreiten, wurde nun eine 1:2 Verdünnung der Probe 2 hergestellt, die rechnerisch bei 8,75 ng/mL liegen sollte. Ausgehend von der vorherigen Messung bei 8,49 ng/mL.

Die Messung der dritten Probe ergab einen Mittelwert von 8,13 ng/mL. Die Standardabweichung in mit 4,35 höher als bei den vorherigen Messungen. Auch der VK ist deutlich höher bei 53,4 %. In einem Konzentrationsbereich von ca. 8 ng/mL ist keine richtige Messung mehr möglich.

Anhand der Berechnung mit der für das LOD vorgesehenen Formel liegt das LOD bei 13,34 ng/mL.

$$LOD = LOB + 1,645 \times SD_{(lowest\ conc.\ sample)}$$

Formel 16

$$LOD = 8,369\ ng/mL + 1,645 \times 3,03$$

$$LOD = 13,34\ ng/mL$$

Als Limit of Quantification wird die Konzentration der letzten unter 20 % gemessenen Probe angenommen. Der LOQ entspricht somit 16,98 ng/mL.

Unter Berücksichtigung der Verdünnung von 1:10, die in die Ermittlung der Werte mit einbezogen wird, ergibt sich somit die untere Assaygrenze von 133,40 ng/mL oder 0,1334 µg/mL.

### 5.7.4 Präzision

Die Präzision beschreibt die Genauigkeit, in der der Assay Ergebnisse reproduziert. Wie in Kapitel 4.2.12.4 beschrieben, werden drei verschiedene Arten der Präzision aus der Messung errechnet. Die Messung für Ceftazidim richtet sich nach dem Standard der IVDD 98/79/EC. Die Messung der sechs Verlaufsproben erfolgte zeitgleich auf zwei Geräten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Die Within-Run Präzision beschreibt die Präzision in einem Lauf. Alle Proben wurden in der Vorbereitung des Versuchs 1:100 in Probenverdünnungspuffer verdünnt. Das reale Ergebnis der Proben ist mit einer Multiplikation mit dem Faktor 100 zu errechnen. Die Ergebnisse des Gerät 1 (Tabelle 37) ergeben eine mittlere Präzision von 3,0 % über einen Konzentrationsbereich von 215,0 – 973,40 ng/mL dies entspricht 21,50 – 97,34 µg/mL. Die Kiteigenen Kontrollen haben im niedrigen Konzentrationsbereich von 80,35 ng/mL einen Variationskoeffizient von 8,2 %, die hohe Kontrolle bei 759,70 ng/mL wird mit einer Abweichung von 2,6 % gefunden. Das Kriterium für das erfolgreiche Bestehen dieses Versuches liegt bei einem VK von <10 %. Dieses Kriterium ist für alle Proben und Kontrollen erfüllt.

Tabelle 37: Within- Run Präzision des Ceftazidim Assays.

Probe	Mittelwert Konzentration (ng/mL) 1:100	VK(%)	n	Kriterium VK% = <10 %
P1	973,40	2,1	5	
P2	477,60	2,5	5	
P3	366,80	1,5	5	
P4	571,60	1,3	5	
P5	215,00	7,1	5	
P6	268,80	3,6	5	
Mittelwert VK (%) Proben		3,0		
C1	80,35	8,2	10	
C2	759,70	2,6	10	

Die Auswertung der Messungen für die between-run Präzision, bei der die Läufe an verschiedenen Tagen auf einem Gerät betrachtet werden. Ergibt sich für die Proben ein Konzentrationsbereich von 205,20- 966,28 ng/mL. Dies entspricht 20,52- 96,63 µg/mL.

Die Präzision über diesen Messbereich unter Einbeziehung der Varianz der Messung an verschiedenen Tagen ergab im Mittel einen VK von 4,7 % (Tabelle 38). Dabei wurden jeweils 25 Messungen pro Probe mit einberechnet.

Für die Kontrollen, die jeweils in zwei Bestimmungen pro Lauf gemessen wurden, ergibt sich so eine Anzahl von zehn Messungen. Der VK lag hier im niedrigen Bereich von 80,35 ng/mL bei 6,7 %, im hohen Bereich bei einer Konzentration von 759,70 ng/mL bei 3,0 %. Alle ermittelten VK liegen mit <10 % unter dem Kriterium VK <15 %. Somit sind die Anforderungen an die Between-Run Präzision erfüllt.



Zuletzt wurde die Präzision bei der Messung auf verschiedenen Geräten betrachtet. Da zwei Geräte für die Erhebung der Daten genutzt wurden, ergibt sich für die Proben eine Anzahl von 50 Messungen, für die Kontrollen eine Anzahl von 20. Die between-Device Präzision im Konzentrationsbereich von 201,74 - 991,14 ng/mL, was 20,17 - 99,11 µg/mL entspricht beträgt im Mittel 6,2 % (Tabelle 38). Wie in den Auswertungen der vorangegangenen Präzisionsversuchen liegt auch bei der between-Device Präzision der VK der niedrigen Kontrolle, mit 10,4 % bei einer Konzentration von 77,02 ng/mL, höher als jener der hohen Kontrolle mit einer Konzentration von 775,70 ng/mL und einem VK von 4,9 %.

Das Kriterium, was für diesen Versuch die Bewertungsgrundlage darstellt, wurde aber dennoch für alle Proben und Kontrollen erfüllt. Alle gefundenen VK liegen unter 15%.

Tabelle 38: Between- Run-Präzision des Ceftazidim Assays.

Probe	Mittelwert Konzentration (ng/mL) 1:100	VK (%)	n	Kriterium VK = <15 %
P1	966,28	3,0	25	
P2	465,84	4,7	25	
P3	361,68	4,6	25	
P4	563,60	3,4	25	
P5	205,20	8,1	25	
P6	267,80	4,5	25	
Mittelwert VK (%) Proben		4,7		
C1	80,35	6,7	10	
C2	759,70	3,0	10	

Tabelle 39: Between-Device – Präzision des Ceftazidim Assays.

Probe	Mittelwert Konzentration (ng/mL) 1:100	VK(%)	n	Kriterium VK = <15 %
P1	991,14	4,7	50	
P2	468,30	7,1	50	
P3	353,56	8,5	50	
P4	562,96	3,3	50	
P5	201,74	7,6	50	
P6	269,54	6,1	50	
Mittelwert VK (%) Proben		6,2		
C1	77,02	10,4	20	
C2	775,70	4,9	20	

Linezolid

Die Messung für Linezolid richtet sich nach dem Standard der IVDR (EU) 2017/746). Die Messung der sechs Verlaufsproben erfolgte zeitgleich auf drei Geräten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen.

Alle Proben wurden auf dem DRG:HYBRiD-XL mit der automatischen Verdünnung verdünnt. Das in der Tabelle ausgegebene Ergebnis entspricht also den realen Werten. Die Proben wurden in 6-fach Bestimmung gemessen, die Kontrollen jeweils in zweifacher Bestimmung pro Lauf. Da wenn die automatische Verdünnung verwendet wird, zwei Cartridges pro Probenbestimmung benötigt werden, können nicht alle Proben im selben Lauf gemessen werden. Somit ergeben sich mehr Messungen der Kontrollen, da mehr Läufe für die Messung aller Proben benötigt werden. Die Ergebnisse des Gerätes 1 (Tabelle 40) ergeben eine mittlere Präzision von 4,4 % über einen Konzentrationsbereich von 681,24 - 11022,40 ng/mL dies entspricht 0,68 – 11,03 µg/mL. Die kriteigenen Kontrollen haben im niedrigen Konzentrationsbereich von 239,00 ng/mL einen Variationskoeffizient von 2,0 %, die hohe Kontrolle bei 868,25 ng/mL wird mit einer Abweichung von 1,3 % gefunden.

Das Kriterium für das erfolgreiche Bestehen dieses Versuches liegt bei einem VK von <10 %. Dieses Kriterium ist für alle Proben und Kontrollen erfüllt.

Tabelle 40: Within-Run Präzision des Linezolid Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL.

Probe	Mittelwert Konzentration (ng/mL)	VK (%)	n	Kriterium VK = <10 %
P1	5924,80	4,8	5	
P2	681,24	6,3	5	
P3	10.152,00	4,3	5	
P4	8221,20	2,4	5	
P5	11.022,40	5,4	5	
P6	7564,80	3,3	5	
Mittelwert VK (%) Proben		4,4		
C1	239,00	2,0	2	
C2	868,25	1,3	2	

Die Auswertung der Messungen für die between-run Präzision, bei der die Läufe an verschiedenen Tagen auf einem Gerät betrachtet werden. Die Proben wurden in einem Konzentrationsbereich von 705,17- 11.401,33 ng/mL gemessen. Dies entspricht 0,71- 11,40 µg/mL.

Die Präzision über diesen Messbereich unter Einbeziehung der Varianz der Messung an verschiedenen Tagen ergab im Mittel einen VK von 8,5 %(Tabelle 41). Dabei wurden jeweils 25 Messungen pro Probe mit einberechnet.

Für die Kontrollen, die jeweils in Doppelbestimmung pro Lauf gemessen wurden, ergibt sich so eine Anzahl von 20 Messungen. Der VK lag hier im unteren Konzentrationsbereich von 230,42 ng/mL bei 5,4 %, im hohen Bereich bei einer Konzentration von 860,58 ng/mL bei 3,9 %. Alle ermittelten VK liegen mit <10 % unter dem Kriterium VK <15 %. Somit sind die Anforderungen an die Between-Run Präzision erfüllt. Abschließend wurde die Präzision der Messung auf verschiedenen Geräten untersucht. Da drei Geräte für die Erhebung der Daten genutzt wurden, ergibt sich für die Proben eine Anzahl von 75 Messungen, für die Kontrollen eine Anzahl von 60. Die between-Device Präzision im Konzentrationsbereich von 705,17- 11401,33 ng/mL, was 0,71- 11,40 µg/mL entspricht, beträgt im Mittel 10,1 % (Tabelle 42). Die Kontrolle 1 (C1) wird mit einem VK von 6,1 %, die C2 mit einem VK von 4,2 % gefunden.

Tabelle 41: Between-Run Präzision des Linezolid Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL

Probe	Mittelwert Konzentration (ng/mL)	VK (%)	n	Kriterium VK = <15 %
P1	6259,33	7,4	25	
P2	705,17	9,0	25	
P3	10.168,13	9,0	25	
P4	8435,20	8,2	25	
P5	11.401,33	8,9	25	
P6	7852,00	8,2	25	
Mittelwert VK (%) Proben		8,5		
C1	230,42	5,4	20	
C2	860,58	3,9	20	

Tabelle 42: Between-Device Präzision des Linezolid Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL

Probe	Mittelwert Konzentration (ng/mL)	VK (%)	n	Kriterium VK = <15 %
P1	6259,33	8,5	75	
P2	705,17	10,4	75	
P3	10.168,13	10,0	75	
P4	8435,20	10,2	75	
P5	11.401,33	11,1	75	
P6	7852,00	10,3	75	
Mittelwert VK(%) Proben		10,1		
C1	230,42	6,1	60	
C2	860,58	4,2	60	

### 5.7.5 Überprüfung der Richtigkeit der Messung

Für die Ermittlung der Richtigkeit der Messung der Assays wird wie in 4.2.12.4 beschrieben eine sechsfache Messung der drei unterschiedlichen Eureka Kit Kontrollen LC79016 durchgeführt.

#### Ceftazidim

Für die Prüfung von Ceftazidim wurde aus der Lot 006 das Level 5 mit einer ausgegebenen Konzentration von 61,1 µg/mL verwendet. Des Weiteren wurde das Level 6 der Lot 006 mit einer Konzentration von 96,7 µg/ml und das Level 6 der Lot 007 verwendet. Hier beträgt die Konzentration 9,9 µg/mL.

Tabelle 43: Richtigkeit des Ceftazidim Assays. Die Messung erfolgte mit den DRG:HYBRiD-XL. Die verwendeten Proben sind unter der Bestellnummer LC79016 erhältlich.

Probe	Zielwert 1:100 (ng/mL)	gemessene Konzentration ng/mL	Akzeptanzbereich ng/mL (± 20 %)	
Eureka Kit LC79016 Lot006 Level 6	967,00	931,00	773,60	1160,40
		968,00		
		875,00		
		948,00		
		963,00		
		872,20		
Mittelwert ng/mL	926,20			
VK %	4,6			
Bias ng/mL	40,8			
Bias %	-4,2			
Eureka Kit LC79016 Lot006 Level 5	611,00	600,00	448,80	733,20
		592,00		
		585,00		
		574,00		
		601,00		
		590,00		
Mittelwert ng/mL	590,33			
VK %	1,7			
Bias ng/mL	20,67			
Bias %	-3,4			

	Zielwert 1:100 (ng/mL)	gemessene Konzentration ng/mL	Akzeptanzbereich ng/mL (± 20%)	
Eureka Kit LC79016 Lot007 Level 6	99,00	98,60	79,20	118,80
		101,00		
		101,00		
		97,00		
		103,00		
		106,00		
Mittelwert ng/mL	101,10			
VK %	3,2			
Bias ng/mL	-2,1			
Bias %	2,1			

Die Proben wurden für die direkte Messung 1:100 vorverdünnt. So ergeben sich die in Tabelle 43 beschriebenen Zielwerte. Die höchste Probe mit einer erwarteten Konzentration von 967,00 ng/mL wurde in der 6-fach Bestimmung mit einem Wert von 926,20 ng/mL gefunden. Der Variationskoeffizient der Messung lag bei 4,6 %. Die Abweichung vom Zielwert in ng/mL entspricht 40,8 ng/mL, dies entspricht einer Abweichung von 4,2 %.

Der Level 5 Kalibrator des Eureka Kits der Lot 006, der einen Zielwert von 611,00 ng/mL hat, wurde in der mehrfachen Bestimmung bei 590,33 ng/mL gefunden. Der VK der Messungen lag bei 1,7 %. Die Abweichung vom Zielwert lag bei 20,67 ng/mL, dies entspricht einer prozentualen Abweichung von -3,4 %.

Die niedrigste in der Versuchsdurchführung gemessene Probe lag bei 99,00 ng/mL. Der Mittelwert der Messungen ergab einen Wert von 101,10 ng/mL. Der VK der sechs Konzentrationen lag bei 3,2 %. Insgesamt wich die Messung um 2,1 ng/mL ab, dies entspricht 2,1 %.

Der Bland-Altman Plot für die grafische Auswertung der Genauigkeit zeigt, dass in den hohen Konzentrationsbereichen, ab 611,00 ng/mL die Proben um bis zu 10 % niedriger als erwartet gemessen werden. Die niedrig konzentrierte Probe wurde um bis zu 5 % höher gemessen als erwartet.

Die Abweichungen der Einzelmessungen der niedrigsten Probe sind bis zu 7,1 %. Dies lässt sich gut mit dem unter 5.7.4 ermittelten Präzision für die 1. Kontrolle übereinbringen, da der Konzentrationsbereich der Proben ähnlich ist. Die höchste Probe zeigt bei zwei Messungen auch eine Abweichung von 10 %. Im Mittelwert sind die Messergebnisse allerdings einheitlich und mit einer Abweichung von 4,2 % als gut zu bewerten. Alle Messergebnisse liegen noch weit unter dem Akzeptanzbereich von <15 %.

Der Ceftazidime Assay zeigt gut vergleichbare Messergebnisse im Vergleich zu dem Eureka Kit LC79016.

### Ceftazidim- Bland-Altman Plot

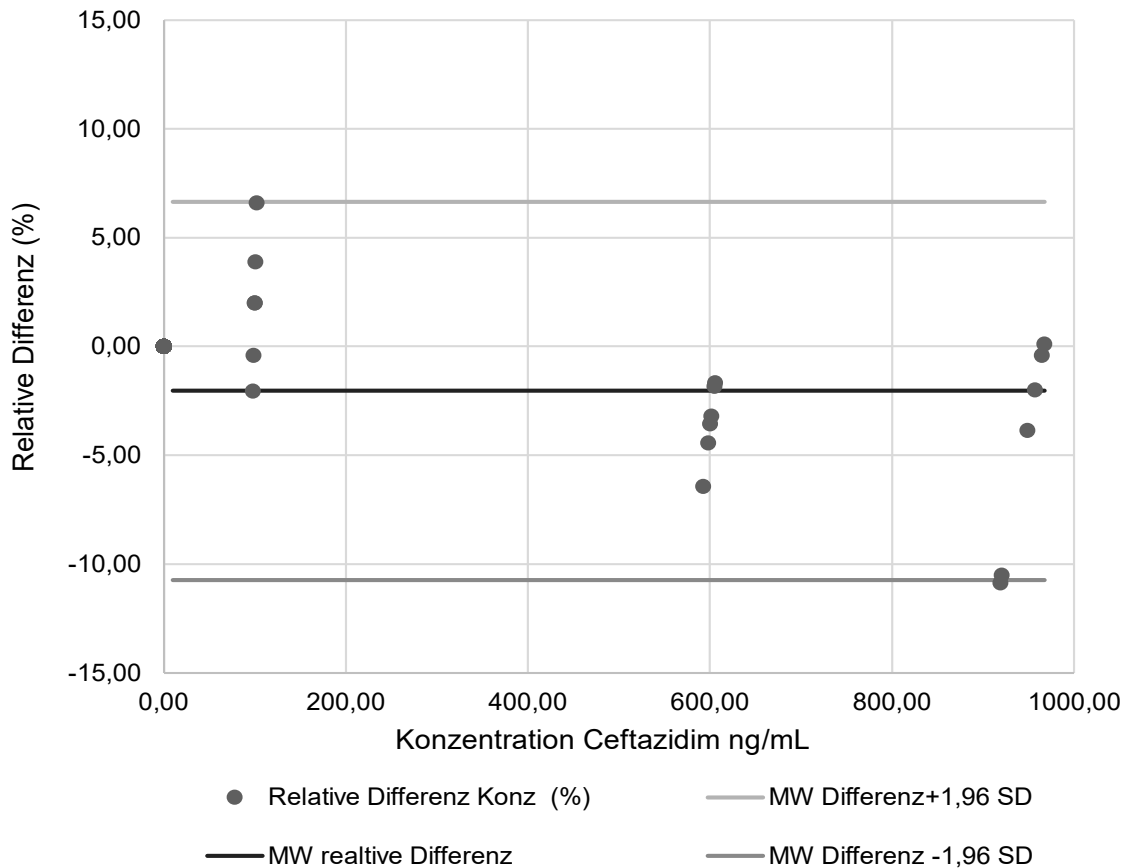


Abbildung 48: Bland Altman Plot relative Differenz der Messungen vom Zielwert in % in Abhängigkeit von der Konzentration an Ceftazidim (ng/mL) in der Probe. Zusätzlich ist das Konfidenzintervall durch die beiden hellgrauen Linien.

#### Linezolid

Für die Prüfung der Richtigkeit der Messung des Linezolid Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL wurde das EUREKA Kit LC79016 mit zwei verschiedenen Lots verwendet.

Die Ermittlung der Korrektheit der Messung wurde aus der Lot 006 das Level 3 mit einer ausgegebenen Konzentration von 2,7 µg/mL verwendet. Des Weiteren wurde das Level 5 der Lot 006 mit einer Konzentration von 10,2 µg/ml und das Level 3 der Lot 007 verwendet. Hier beträgt die Konzentration 1,2 µg/mL.

Da alle Proben in diesem Assay 1:10 vorverdünnt werden, werden die Zielwerte in ng/mL und der 1:10 Verdünnung betrachtet.

Der höchste gemessene Kalibrator bei 1020 ng/mL wird mit einem Mittelwert von 919,33 aus der sechsfachen Messung eine Abweichung von 100,67 ng/mL zum Zielwert.

Dies entspricht einer Abweichung von 9,9 % (Tabelle 44). Der VK der Messung betrug 6,7 %. Das Level 3 der Lot 006, das eine Konzentration von 270 ng/ml haben soll, wird auf dem DRG:HYBRiD-XL mit einer Konzentration von 281,67 ng/ml gemessen.

Damit weicht die Messung um 11,67 ng/mL vom Zielwert ab. Dies entspricht 4,3 %.

Der VK der Messergebnisse war 3,6 %.

Tabelle 44: Richtigkeit des Linezolid Assays. Die Messung erfolgte mit den DRG:HYBRiD-XL.

Verwendete Kalibratoren des EUREKA Kits LC79016.

Probe	Zielwert 1:10 (ng/mL)	gemessene Konzentration ng/mL	Akzeptanzbereich ng/mL (± 20 %)	
Eureka Kit LC79016 Lot006 Level 5	1020,00	872,00	816,00	1224,00
		994,00		
		864,00		
		879,00		
		1000,00		
		907,00		
	Mittelwert ng/mL	919,33		
VK %	6,7			
Bias ng/mL	-100,67			
Bias %	-9,9			
Eureka Kit LC79016 Lot006 Level 3	270,00	280,00	216,00	324,00
		299,00		
		274,00		
		274,00		
		275,00		
		288,00		
	Mittelwert ng/mL	281,67		
VK %	3,6			
Bias ng/mL	11,67			
Bias %	4,3			
Eureka Kit LC79016 Lot007 Level 3	120,00	144,00	96,00	144,00
		132,00		
		147,00		
		139,00		
		142,00		
		126,00		
	Mittelwert ng/mL	138,33		
VK %	5,7			
Bias ng/mL	18,33			
Bias %	15,3			

Die niedrigste Probe in diesem Versuch hat einen Zielwert von 120,00 ng/mL.

Diese wurde im Mittel bei 138,33 ng/mL gemessen. Dies liegt 18,33 ng/mL über dem Zielwert.

Das entspricht bei einer Probe von 120,00 ng/mL eine prozentuale Abweichung von 15,3 %.

In der Auswertung der Ergebnisse mit dem Bland-Altman Plot ist zu erkennen, dass die beiden Proben, die unterhalb von 400 ng/mL liegen zu hoch gemessen werden.

Gerade die niedrige Probe bei 120 ng/mL zeigt eine große Spreizung der Messergebnisse. Dies lässt vermuten, dass die Präzision bei einer so niedrigen Konzentration nicht zufriedenstellend ist. Betrachtet man aber die Ergebnisse der Präzision, so wird eine Probe, die 70,5 ng/mL in einem VK von 6,3 % bei der fünffachen Messung gefunden. Werden mehr Läufe in die Auswertung einbezogen, so ergibt sich ein VK von 9,0 %. Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist eine Abweichung von bis zu 10% zu erwarten. Teilweise wurden aber Messungen mit bis zu

18,4 % höheren Werten gefunden. Der Mittelwert der Messungen erfüllt aber die geforderten Akzeptanzkriterien von <15% Abweichung. Auch bei der höchsten, gemessenen Probe zeigen sich diese hohen Abweichungen von bis zu 17 %. Allerdings ist die Abweichung der Messung hier bei vier von 6 Messungen in etwa gleich. Die Konzentrationen dieser vier Bestimmungen liegen 12,5 %-18,1 % niedriger als der erwartete Zielwert. Dies deutet auf eine nötige Anpassung der Standardkurve in diesem Konzentrationsbereich hin, auch wenn die Akzeptanzkriterien erfüllt wurden. Eine Anpassung der Standardkurve wird in Betracht gezogen, allerdings sollte zunächst der Methodenvergleich abgeschlossen werden.

Dieser zeigte im ersten Ansatz eine Abweichung der Proben von durchschnittlich 30 %. Durch eine Korrektur der Standardkurve um 10 % über den gesamten Messbereich war es möglich, den Methodenvergleich mit einer durchschnittlichen Wiederfindung der Proben 101 % (5.8.2).

### Linezolid- Bland-Altman Plot

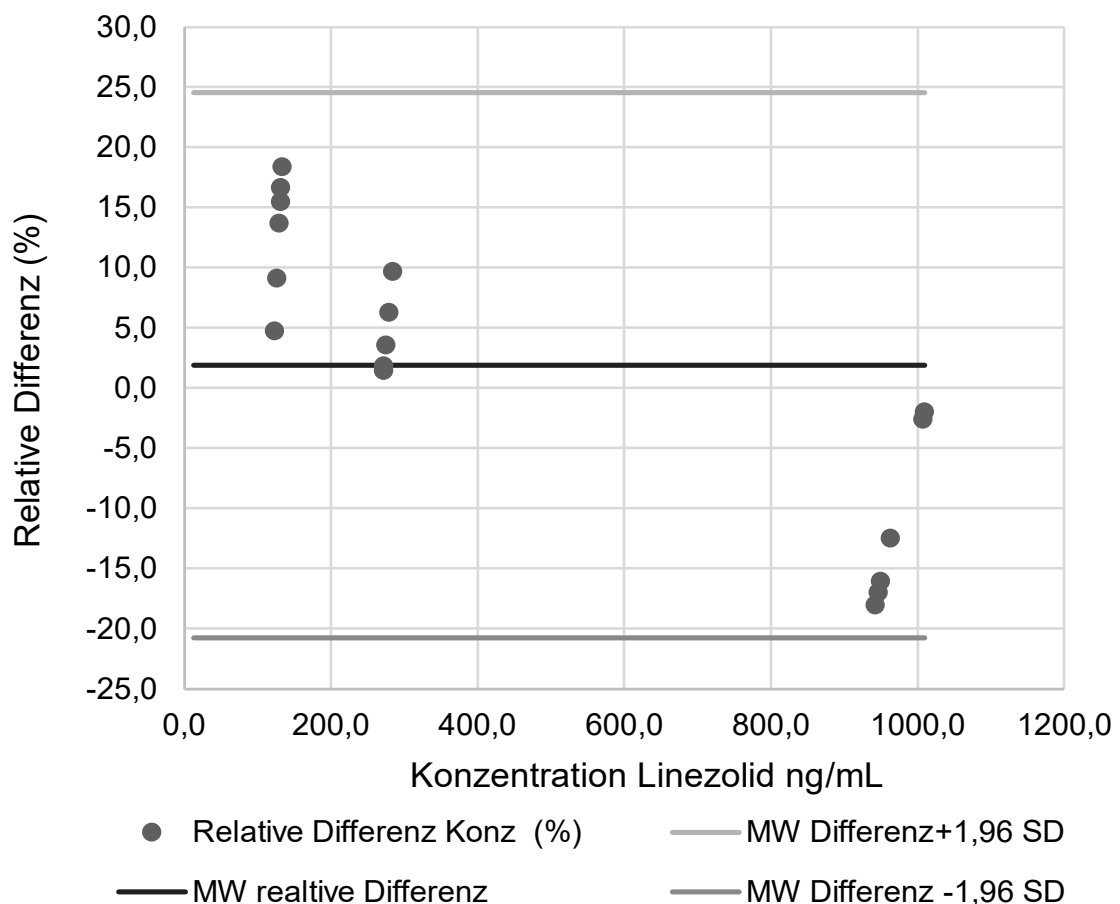


Abbildung 49: Bland Altman Plot der Ergebnisse der Ermittlung der Richtigkeit der Messung des Linezolid Assays auf dem DRG:HYBRiD-XL. Gezeigt ist die relative Differenz der Messung in % in Abhängigkeit der Konzentration an Linezolid bis 1200 ng/mL in der Probe. Zusätzlich ist das Konfidenzintervall mit + und - 1,96SD angegeben.



### 5.7.6 Linearität

In der Routine der Labore ist es manchmal vonnöten eine Verdünnung der Probe durchzuführen, da zu wenig Probenmaterial vorhanden ist oder da die Probe über dem Messbereich des Assays gefunden wurde.

Die Überprüfung der Linearität wird wie in 4.2.12.7 beschrieben nach manueller Verdünnung auf dem DRG:HYBRiD-XL durchgeführt.

Da für beide Assays auf dem Gerät eine automatische Vorverdünnung von 1:100 (Ceftazidim) und 1:10 (Linezolid) durchgeführt wird, werden die weiteren Verdünnungsschritte manuell vor Testarbeitung erstellt. Für die Überprüfung der linearen Verdünnung des Ceftazidim Assays wurden Proben im Konzentrationsbereich von 19550- 80500 ng/mL verwendet. Zusätzlich wurde eine Probe mit Konzentration über dem Messbereich des Assays in den Messbereich hineinverdünnt.

Außerdem wurde versucht alle Probenotypen zu repräsentieren die gemessen werden können (4.3.5.1). Die beiden Serumproben lassen sich linear bis zu einer Verdünnung von 1:16 verdünnen. Die Wiederfindung zum erwarteten Wert liegen hierbei immer im Akzeptanzbereich von  $\pm 15\%$  (Tabelle 45).

Tabelle 45: lineare Verdünnung von vier Serum und Plasma Proben mit dem Ceftazidim Assay auf DRG:HYBRiD-XL-XL. Die Verdünnung wurde von 1:2 bis 1:16 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die automatische 1:100 Verdünnung wurde auf dem Gerät durchgeführt. Zusätzlich ist die Wiederfindung (%) zum erwarteten Zielwert angegeben. Grau unterlegte Messungen liegen unter dem LOQ (5.7.3)

Probe 1				
Probenotyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
Serum	unverdünnt	80.500,00	80.500,00	-
	1:2	42.400,00	40.250,00	105,3
	1:4	22.950,00	20.125,00	114,0
	1:8	11.350,00	10.062,50	112,8
	1:16	5525,00	5031,25	109,8

## Ergebnisse und Diskussion

Probe 2				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
Serum	unverdünnt	77.050,00	77.050,00	
	1:2	39.900,00	38.525,00	103,6
	1:4	21.000,00	19.262,50	109,0
	1:8	10.750,00	9631,25	111,6
	1:16	5460,00	4815,63	113,4

Probe 3				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
Citrat- Plasma	unverdünnt	19.550,00	19.550,00	
	1:2	9735,00	9775,00	99,6
	1:4	4440,00	4887,50	90,8
	1:8	1715,00	2443,75	70,2
	1:16	0,00	1221,88	0,00

Probe 4				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
EDTA- Plasma	unverdünnt	38.250,00	38.250,00	
	1:2	19.550,00	19.125,00	102,2
	1:4	10.500,00	9562,50	109,8
	1:8	5180,00	4781,25	108,3
	1:16	5460,00	4815,63	113,4

Die Probe aus Citrat-Plasma zeigt ab einer Verdünnung von 1:8 eine Wiederfindung unter dem Akzeptanzbereich. Allerdings liegt die gemessene Konzentration unter dem LOQ, sodass sie nicht in die Bewertung miteinbezogen wird. Der LOQ ist in diesem Fall bei 2100 ng/mL, da hier die 1:100 Verdünnung der Proben mit einbezogen wird.

Die Wiederfindung der ersten beiden Verdünnungsschritte liegt zwischen 90,8- 99,6 %, was die Akzeptanzkriterien erfüllt.

Die vierte gemessene Probe aus EDTA-Plasma mit einer Konzentration von 38.250,00 ng/mL wird bis zu einer 1:16 Verdünnung im Akzeptanzbereich von  $\pm 15$  % Wiederfindung gefunden.

Tabelle 46: Linearität bei kleinschrittiger Verdünnung einer Serumprobe mit dem Ceftazidim Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL. Die Verdünnung wurde von 1:1,25 bis 1:2 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die 1:100 Verdünnung der Proben wurde automatisch auf dem Gerät durchgeführt.

Probe 6				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
Serum	unverdünnt	32.600,00	32.600,00	
	1: 1,25	27.000,00	26.080,00	103,5
	1: 1,5	22.000,00	21.733,33	101,2
	1: 1,75	19.050,00	18.628,57	102,3
	1:2	16.750,00	16.300,00	102,8

Die kleinschrittige Verdünnung einer Probe mit einer Konzentration von 32600 ng/mL war mit nur wenig Abweichungen von der erwarteten Konzentration möglich.

Die Wiederfindung wurden zwischen 101,2 - 103,5 % gefunden.

Zusätzlich wurde auch eine Probe, die sich außerhalb des Messbereiches befindet, verdünnt, bis sie den Messbereich erreicht und dann weiter verdünnt.

Diese Probe wurde in humanem Serum durch Spiken hergestellt. Die Konzentration sollte rechnerisch  $20 \times S_{max}$  betragen. Dies entspräche einer Konzentration von 4.000.000 ng/mL (4000 µg/mL).

Bei Betrachtung der Messung (Tabelle 47) ist zu beobachten, dass die Probe wie erwartet ab der 1:32 Verdünnung im Messbereich zu finden war. Die erste Messung im Messbereich ist mit 82,4 % Wiederfindung zum erwarteten Wert zu niedrig. Die nächste gemessene Konzentration passt mit 88,1 % Wiederfindung zu den geforderten Akzeptanzkriterien. In den weiteren Verdünnungsschritten ist zu beobachten, dass die Wiederfindung zum erwarteten Wert ansteigt. Das heißt bei zunehmender Verdünnung der Probe nimmt der Wert nicht wie zu erwarten linear ab. In der

Abbildung 50 ist zu sehen, dass die Werte unter einer Konzentration von 40.000 ng/mL zu hoch im Vergleich zu den erwarteten Werten gemessen werden. Da aber andere Proben in diesem Messbereich noch gut zu Verdünnen waren kann diese Abweichung auf die fortgeschrittene Verdünnungsfolge zurückzuführen sein. Bei dieser Verdünnung sind nur noch 3,9 µL der Originalprobe enthalten. Zusätzlich wird noch eine 1:100 Verdünnung auf dem Gerät gemacht, was zu einem Restvolumen von 0,04 µL der Originalprobe in der zu vermessenen Probe führt. Es ist anzunehmen, dass der starke Überschuss an Probenverdünnungspuffer in der Probe zu diesen Ungenauigkeiten in der Messung führt.

Tabelle 47: Verdünnung einer Probe  $20 \times S_{max}$ . Die Verdünnung wurde von 1:2 bis 1:1024 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die 1:100 Verdünnung der Proben wurde automatisch auf dem Gerät durchgeführt.

Probe 5
---------

Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung(%)
Serum 20x S <sub>max</sub>	unverdünnt	>200.000	400.0000,00	
	1:2	>200.000	200.0000,00	
	1:4	>200.000	100.0000,00	
	1:8	>200.000	500.000,00	
	1:16	>200.000	250.000,00	
	1:32	103.000	125.000,00	82,4
	1:64	55.050	62.500,00	88,1
	1:128	36.150	31.250,00	115,7
	1:256	20.250	15.625,00	129,6
	1:512	11.550	7812,50	147,8
	1:1024	5900	3906,25	151,0
			MW- Wiederfindung %	119,1

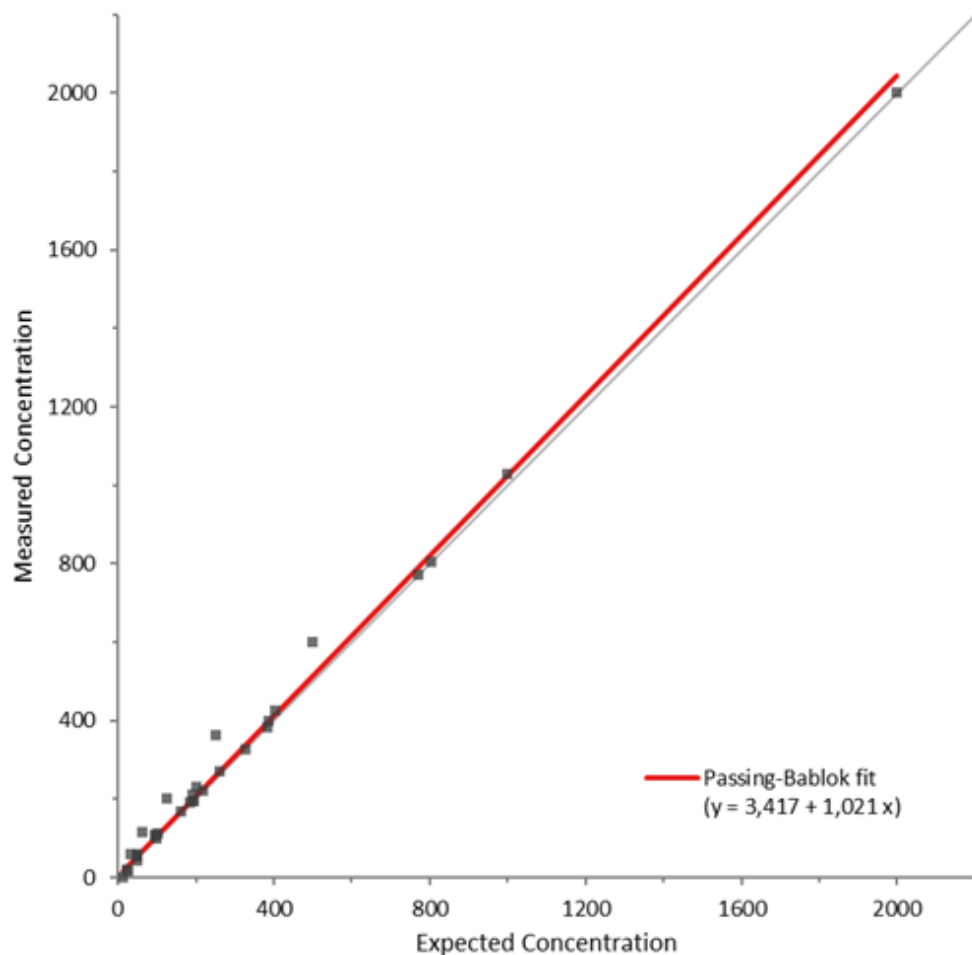


Abbildung 50: Passing-Bablok der linearen Verdünnung. Gezeigt ist das Verhältnis der erwarteten zu der gemessenen Ceftazidim Konzentration. Zusätzlich ist eine lineare Trendline erstellt worden, die die Steigung  $y=3,417+1,021x$  hat.

Linezolid

Für die Überprüfung der linearen Verdünnung des Linezolid Assays wurden Proben im Konzentrationsbereich von 951- 8445 ng/mL verwendet.

Zusätzlich wurde eine Probe (Probe 5) mit Konzentration über dem Messbereich des Assays in den Messbereich hineinverdünnt. Zusätzlich wurde versucht alle Probenotypen zu repräsentieren (5.7.1). Die beiden Serumproben lassen sich linear bis zu einer Verdünnung von 1:16 verdünnen. Die erste Probe liegt dabei bei einer Konzentration von 8445,00 ng/mL, die Probe zwei bei einer geringen Konzentration von 951,00 ng/mL.

Die Wiederfindung zum erwarteten Wert liegen hierbei immer im Akzeptanzbereich von  $\pm 15\%$  (Tabelle 48). Probe drei, welche aus EDTA-Plasma besteht und eine Konzentration von 6905 ng/mL aufweist wurde ebenfalls innerhalb der Akzeptanzkriterien gefunden.

Tabelle 48: Lineare Verdünnung von vier Serum und Plasma Proben mit dem Linezolid Assay auf DRG:HYBRiD-XL-XL. Die Verdünnung wurde von 1:2 bis 1:16 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die 1.10 Vorverdünnung der Proben wurde auf dem Gerät durchgeführt. Die grau hinterlegten Felder erfüllen nicht das vorgegebene Akzeptanzkriterium von  $\pm 15\%$ .

Probe 1				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
Serum	unverdünnt	8445,00	8445,00	100,00
	1:2	4150,00	4222,50	98,3
	1:4	2180,00	2111,25	103,3
	1:8	1039,00	1055,63	98,4
	1:16	474,50	527,81	89,9
Probe 2				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
Serum	unverdünnt	951,00	951,00	100,00
	1:2	472,50	475,50	99,4
	1:4	217,50	237,75	91,5
	1:8	105,00	118,88	88,3
	1:16	54,95	59,44	92,5
Probe 3				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
EDTA-Plasma	unverdünnt	6905,00	6905,00	100,00
	1:2	3705,00	3452,50	107,3
	1:4	1765,00	1726,25	102,2
	1:8	787,00	863,13	91,2
	1:16	372,00	431,56	86,2
Probe 4				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration	Wiederfindung (%)

			ng/mL	
Citrat-Plasma	unverdünnt	5935,00	5935,00	100,00
	1:2	2500,00	2967,50	84,2
	1:4	1180,00	1483,75	79,5
	1:8	556,00	741,88	74,9
	1:16	292,00	370,94	78,7

Die vierte gemessene Probe mit einer Konzentration von 5935,00 ng/mL wurde schon in der ersten Verdünnung unterhalb des Akzeptanzbereichs von  $\pm 15\%$  gefunden. Die 1:2 Verdünnung zeigt eine Wiederfindung des zu erwartenden Werts von 84,2 %.

Alle weiteren Verdünnungen zeigen eine Wiederfindung unter 80 %.

Da die Probe drei in einem ähnlichen Konzentrationsbereich gute Wiederfindungen zeigt, ist davon auszugehen, dass diese schlechte Wiederfindung mit dem Probenotyp zusammenhängt. In der Prüfung der verschiedenen Probenotypen in Kapitel 5.7.1 fällt auf, dass bei der Messung der Citrat-Plasma Proben die Wiederfindung niedriger ist als die der anderen Probenotypen (Tabelle 36). Da aber alle Akzeptanzkriterien des Versuchs erfüllt wurden, wurden Citrat-Plasma Proben für den Assay zugelassen. Auf Grundlage der Ergebnisse aus der Prüfung der Linearität war es fraglich, ob Citratplasma als Probenotyp für diesen Assay auszuschließen oder zu bestätigen.

Daher wurde, wie in Tabelle 49 dargestellt, noch zwei weitere Proben mit Citrat-Plasma als Probenotyp hergestellt und gemessen. Beide Proben in verschiedenen Konzentrationsbereichen erfüllen bis zu einer Verdünnung von 1:8 die Akzeptanzkriterien. Bei einer 1:16 Verdünnung zeigt Probe sieben bei einer erwarteten Konzentration von 331,81 ng/mL eine gemessene Konzentration von 279,00 ng/mL. Diese weicht mehr als 15,0 % von dem erwarteten Wert ab. Probe acht hingegen zeigt auch bei einer 1:16 Verdünnung noch eine Wiederfindung zum Zielwert von 85,5 %.

Es ist festzuhalten, dass Citrat-Plasma Proben mit dem Linezolid-Assay gemessen werden können.

Allerdings würde es sich anbieten in weiterführenden Versuchen den Verdünnungspuffer zu betrachten, da dieser mit einem pH von 5,5 im sauren pH-Wert liegt. Citrat-Plasma Proben sind pH- gepuffert durch die Zugabe von isotoner Natriumcitratlösung (3,8 %) diese wird im Mischungsverhältnis 1:9 verwendet (1 Volumenanteil Citrat Lösung + 9 Volumenanteile Blut) angewendet.

Die Richtigkeit der Messung der anderen Proben mit diesem Verdünnungspuffer könnte an der Veränderung des pH-Werts in diesem Assay liegen. Kann der pH-Wert durch die gepufferte Eigenschaft nicht adäquat oder im selben Verhältnis wie in den anderen Probenotypen gesenkt werden, weicht die Messung ab.

Tabelle 49: Ergänzende Prüfung der Linearität für Citrat-Plasma Proben mit dem Linezolid-Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL.

Probe 7				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
Citrat-Plasma	unverdünnt	5309,00	5.309,00	100,0
	1:2	2360,00	2654,50	88,9
	1:4	1136,00	1327,25	85,6
	1:8	741,00	663,63	111,7
	1:16	279,00	331,81	84,1
Probe 8				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
Citrat-Plasma	unverdünnt	1520,15	1520,15	100,00
	1:2	839,62	760,08	110,5
	1:4	371,00	380,04	97,6
	1:8	171,00	190,02	90,0
	1:16	81,20	95,01	85,5

Die kleinschrittige Verdünnung einer Probe im Konzentrationsbereich von 7830 ng/mL ist innerhalb der Akzeptanzkriterien zu erfüllen. Hier wurde eine Serumprobe verwendet.

Tabelle 50: Ergebnisse der kleinschrittigen Verdünnung einer Serumprobe mit Probenverdünnungspuffer von 1:1,25 -1:2 mit dem Linezolid-Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL..

Probe 6				
Probentyp	Verdünnungsfaktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration ng/mL	Wiederfindung (%)
Serum	unverdünnt	7830,00	7830,00	100,00
	1: 1,25	5845,00	6264,00	93,3
	1: 1,5	5240,00	5220,00	100,4
	1: 1,75	4400,00	4474,29	98,3
	1:2	3330,00	3915,00	85,1

Darüber hinaus wurde auch eine Probe verdünnt, die sich außerhalb des Messbereichs befindet. Diese wurde verdünnt bis sie den Messbereich erreicht hat, dann wurde die Verdünnung im Messbereich weiter fortgeführt.

Die Herstellung dieser Probe erfolgte durch Spiken in humanes Serum. Die Konzentration sollte rechnerisch  $20 \times S_{\max}$  betragen. Dies entspräche einer Konzentration von 700.000 ng/mL (700 µg/mL).

Bei Betrachtung der Messung ist zu beobachten, dass die Probe wie erwartet ab der 1:32 Verdünnung im Messbereich zu finden ist (Tabelle 51). Die erste Messung im Messbereich ist mit einer Wiederfindung von 150 % zu dem erwarteten Zielwert hoch. Die nächste gemessene Konzentration ist mit 138,5 % ebenfalls zu hoch.

Die Wiederfindung würde aufgrund dieser Wiederfindung außerhalb des Akzeptanzkriterium liegen.

Berechnet man aber die Wiederfindung ab dem 1. gemessenen Wert, der sich im Messbereich befindet, so kann man einen Fehler bei der Herstellung der Probe eliminieren. Auch die Möglichkeit, dass die Stocklösung nicht ganz homogen war oder dass Konzentrationsunterschiede durch verschiedene Löslichkeiten in Serum oder Puffer auftreten.

Betrachtet man die Wiederfindung nach der Verdünnung im Vergleich zu den erwarteten Werten ausgehend von der 1. Probe im Messbereich, so erfüllen alle Werte die Akzeptanzkriterien. Die mittlere Wiederfindung aller Messungen liegt bei 90,1 %.

Tabelle 51: Verdünnung einer Probe die  $20 \times S_{\max}$  ist. Die Verdünnung wurde von 1:2 bis 1:2048 in Probenverdünnungspuffer durchgeführt. Die 1:10 Vorverdünnung erfolgt automatisch auf dem Gerät.

Probe 5					
Probentyp	Verdünnungs-faktor	Konzentration Mittelwert ng/mL	erwartete Konzentration rechnerisch ng/mL	erwartete Konzentration rechnerisch ab 1. Wert ng/mL	Wiederfindung (%) zu erwartet ab 1. Wert ng/mL
Serum $20 \times S_{\max}$	Unverdünnt	< 35.000	700.000,00	-	-
	1:2	< 35.000	350.000,00	-	-
	1:4	< 35.000	175.000,00	-	-
	1:8	< 35.000	87.500,00	-	-
	1:16	< 35.000	43.750,00	-	-
	1:32	33.000	21.875,00	33000,00	100,00
	1:64	15.150	10.937,50	16500,00	91,8
	1:128	7260	5468,75	8250,00	88,0
	1:256	3570	2734,38	4125,00	86,5
	1:512	1815	1367,19	2062,50	88,0
	1:1024	981	683,59	1031,3	95,1
	1:2048	469,5	341,80	515,6	91,1
			MW Wiederfindung %		90,1



### 5.7.7 Wiederfindung von gespikten Proben

Die Überprüfung der Wiederfindung ist wichtig, um festzustellen, ob der Nachweis des Analyten durch Unterschiede der Standardmatrix und in der biologischen Probenmatrix beeinträchtigt wird. Bei der Probenmatrix handelt es sich um eine vorverdünnte biologische Probe, welche mit Standardmaterial dotiert wird (4.2.12.6).

Für den Ceftazidim Assay wurden 6 Proben verschiedener Herkunft und Probenotyps verwendet. Insgesamt stellten zwei der sechs Proben reale Patientenseren dar. Eine weitere Serumprobe und jeweils eine Probe der verschiedenen Plasmaarten wurden verwendet.

In jedem Lauf wurden jeweils die Standardlösungen, die zum Spiken genutzt wurden, mitgemessen und die im selben Lauf gemessene Konzentration für die Auswertung angenommen.

Tabelle 52: Übersicht der Ergebnisse für die Wiederfindung von dotierten Proben verschiedener Probenotypen mit dem Ceftazidim- Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL. Der Probenotyp sowie die ermittelte Konzentration und die erwartete Konzentration in ng/mL sind dargestellt. Zusätzlich ist die Wiederfindung (%) zum erwarteten Zielwert angegeben.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Probenotyp	Citrat-Plasma	Serum	Serum (Patient)	Heparin-Plasma	EDTA-Plasma	Serum (Patient)
Konzentration	237,65	339,50	445,00	507,00	602,00	669,00
Mittelwert Wiederfindung%	86,2	95,7	111,9	89,4	95,4	99,6
Min Wiederfindung%	83,4	90,2	110,1	87,6	91,6	97,8
Max Wiederfindung%	88,6	98,6	114,4	91,3	99,9	101,1

Alle gemessenen Proben erfüllen die Akzeptanzkriterien. Es ist allerdings festzustellen, dass die Serumprobe höhere Wiederfindungen zeigt, als die Plasmaproben.

Die Wiederfindung der Messung nach Zugabe der Standardlösung ist im Durchschnitt bei 111,9 %. Andere Serumproben, Probe 2 und 6, weisen allerdings Wiederfindungen im Bereich von 99,6 % und 95,7 % auf. Da alle Akzeptanzkriterien trotzdem erfüllt werden, ist keine weitere Prüfung nötig. Die Probe aus Heparin-Plasma und EDTA-Plasma erfüllen auch die Akzeptanzkriterien. Die Wiederfindung der Probe 4 und 5 (Tabelle 52) ist mit 89,4 % und die Probe mit 95,4 % ermittelt worden. Bei der Probe 1, welche aus Citrat-Plasma besteht, erfüllt der Mittelwert der Wiederfindung (%) mit 86,2 % auch das Akzeptanzkriterium von 85,0-115,0 % Wiederfindung. Allerdings ist die niedrigste gefundene Wiederfindung 83,4 %.

Das Dotieren von Proben mit Standardlösung ist mit allen Probenotypen möglich.

Für die Überprüfung der Wiederfindung dotierter Proben für Linezolid wurden die Proben 1:10 vorverdünnt, um das Spiken mit Standardlösung möglich zu machen. Wie unter 5.7.1 beschrieben können für den Assay alle Probenotypen, Serum und verschiedenen Plasmaarten, verwendet

werden. Im Versuch zur Prüfung der Linearität (5.7.6) war allerdings zu erkennen, dass Citrat-Plasma Proben eine geringere Wiederfindung im Vergleich zu den anderen Probenotypen zeigen (Tabelle 49).

Als Proben in diesem Versuch wurden 3 Serumproben, sowie jeweils eine Plasma Probe der verschiedenen Plasmaarten verwendet.

Es ist zu sehen, dass alle Proben (Probe 1-6) die Akzeptanzkriterien erfüllen.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Proben ohne Interferenzen den zu erwartenden Konzentrationen entsprechen (Tabelle 53).

Auch die zuvor in der Linearität kritisch betrachtete Citrat-Plasma Probe konnte ohne Abweichung in diesem Versuch gemessen werden. Für die Wiederfindung einer Probe mit hinzugefügten Standardmaterial scheint der Probenotyp im Fall des Linezolid-Assay keinen Einfluss zu haben.

Eine Messung von realen Patientenproben, wie in der Prüfung von Ceftazidim (Tabelle 52) war nicht möglich, da zu diesem Zeitpunkt keine Probe verfügbar waren.

Tabelle 53: Wiederfindung von dotierten Proben verschiedener Probenotypen mit dem Linezolid- Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL. Der Probenotyp sowie die ermittelte Konzentration und die erwartete Konzentration in ng/mL sind dargestellt. Zusätzlich ist die Wiederfindung (%) zum erwarteten Zielwert angegeben.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Probenotyp	Serum	EDTA-Plasma	Serum	Serum	Heparin-Plasma	Citrat-Plasma
Konzentration	880,00	892,00	1205,00	1225,00	1280,00	2180,00
Durchschnittliche Wiederfindung%	99,7	99,5	94,0	89,0	93,0	90,7
Min Wiederfindung%	96,4	88,0	92,8	87,0	88,3	87,2
Max Wiederfindung%	101,1	108,3	96,4	93,5	102,8	94,3

### **5.7.8 Stabilitätsprüfung**

In der Gebrauchsanleitung des Assays werden für alle Kitbestandteile Haltbarkeiten angegeben. Dies dient zum einen, um die Kunden über den Umgang mit den Reagenzien zu informieren, z.B. wenn eine sofortige Kühlung nötig ist. Aber auch, um für die Produktionsplanung einen Überblick zu haben, wie kritisch Lagertemperatur oder Haltbarkeit einzelner Kitkomponenten sind (Magari et al., 2004).

Um ein umfassendes Bild der Stabilität des Assays zu erhalten, werden wie unter 4.2.12.10 aufgeführt mehrere Stabilitätsprüfungen durchgeführt.

Dabei wird sowohl das gesamte Kit gestresst als auch die entnehmbaren Bestandteile, wie die Kontrollen und Rekalibratoren, einzeln.

5.7.8.1 Stabilitätsprüfung der Kontrollen und Rekalibratoren

Für beide Assays sind die Kontrollen und Rekalibratoren jeweils dasselbe Material. Die Prüfung wird mit den Rekalibratoren und damit stellvertretend auch für die Kontrollen durchgeführt.

Ceftazidim

Die Kontrollen und Rekalibratoren des Ceftazidim Assays sind aufgrund der schlechten Stabilität, die in den Vorversuchen des Assays gefunden wurde, lyophilisiert (5.4.1.1.4). Die Versuchsdurchführung wurde demnach mit lyophilisierten Kontrollen durchgeführt, die jeweils am Messtag gelöst wurden. Es wird zwischen den bei 2-8 °C und bei 40 °C gelagerten Rekalibratoren verglichen. Dabei dürfen die gestressten Rekalibratoren nicht mehr als  $\pm 20\%$  abweichen.

Anhand Tabelle 54 ist zu erkennen, dass nach einer Lagerung von sieben Tagen bei 40 °C die ermittelten Konzentrationen der Rekalibratoren noch innerhalb des Akzeptanzbereichs liegen. Somit ist nicht mit einem lagerungsbedingten Abbau der lyophilisierten Rekalibratoren und Kontrollen, zu rechnen.

Tabelle 54: Stabilitätsprüfung von lyophilisierten Ceftazidim-Rekalibratoren in Standardmatrix (4.1.3.1).

	Tag 0 ng/mL	Tag 7 4°C ng/mL	Tag 7 40°C ng/mL	Akzeptanzkriterium 100 $\pm$ 20%
Kontrolle 1	119,75	125,50	103,00	95,80 – 143,70
Kontrolle 2	917,00	1120,00	752,50	733,60 – 1100,40

Zusätzlich ist die Haltbarkeit der Kontrollen und Rekalibratoren nach Rekonstitution zu prüfen. Dafür wird wie in Kapitel 4.2.12.10.2 beschrieben am Tag 0 die Rekonstitution des Lyophilisats durchgeführt. Die Messung erfolgt nach Lagerung bei 2-8°C an 5 aufeinanderfolgenden Tagen. An Tag 4 nach Lösen der Kontrollen (Tag 5) ist bei einer Lagerung im Kühlschrank kein Abbau festzustellen. Die gelösten Kontrollen können somit mindestens für 5 Tage bei 4°C gelagert und verwendet werden.

Tabelle 55: Stabilitätsprüfung von rekonstituierten Ceftazidim-Rekalibratoren in Standardmatrix (3.1.3.1) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen.

	Tag 0 ng/mL	Tag 4 nach Rekonstitution ng/mL	Wiederfindung zu Tag 0 in %	Akzeptanzkriterium 100 $\pm$ 20%
Kontrolle 1	76,90	80,75	105,0	61,52 – 92,28
Kontrolle 2	794,50	757,50	95,3	635,60 – 953,40

Linezolid

Die erste Prüfung der Stabilität in den Vorversuchen der Entwicklung des Linezolid-Assays gab keine Anzeichen für ein mögliches Stabilitätsproblem 5.4.2.3.2.

Es wird zwischen den bei 2-8 °C und bei 40 °C gelagerten Rekalibratoren verglichen. Dabei dürfen die gestressten Rekalibratoren nicht mehr als ± 20 % abweichen.

Wie in Tabelle 56 zu erkennen ist, ist eine Lagerung von sieben Tagen bei 40 °C möglich. Die ermittelten Konzentrationen der Rekalibratoren sind noch innerhalb des Akzeptanzbereichs. Folglich sollte nicht mit einem lagerungsbedingten Abbau der Rekalibratoren und Kontrollen gerechnet werden müssen.

Tabelle 56: Stabilitätsprüfung von ready-to-use Linezolid-Rekalibratoren in Standardmatrix (4.1.3.1).

	Tag 0 ng/mL	Tag 7 4°C ng/mL	Tag 7 40°C ng/mL	Akzeptanzkriterium 100 ± 20%
Kontrolle 1	218,00	204,50	213,00	174,40 – 261,60
Kontrolle 2	828,50	806,50	812,00	662,80 – 994,20

#### 5.7.8.2 Stabilitätsprüfung der Reagenz- Cartridges

Es wurde der Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Cartridges und damit die Reagenzien getestet. Die Stabilitätsprüfung wird bei 40 °C durchgeführt, um durch diese beschleunigte Haltbarkeitsprüfung eine ungefähre Aussage über die Haltbarkeit des Kits geben zu können. Bei einer Lagerung von 7 Tagen bei 40 °C wird darauf geschlossen, dass ein Jahr Haltbarkeit vor Durchführung der Echtzeit-Haltbarkeit angegeben werden kann. Die bei 40 °C gelagerten Cartridges wurden wie in 4.2.12.10.3 beschrieben zur Messung von sechs Proben und zwei Kontrollen verwendet. Die ermittelten Konzentrationen als Referenz mit den an Tag 0 ermittelten Werten verglichen. Es ist eine Abweichung von maximal 20 % der Wiederfindung gestattet. Weiterhin sollen mindestens vier von sechs Proben diese Bedingung erfüllen.

#### Ceftazidim

Die Cartridges des Ceftazidim Assays zeigten an allen Messtagen eine gute Übereinstimmung zu den bei 40 °C gelagerten Cartridges. Alle Proben und Kontrollen wurden innerhalb der Akzeptanzkriterien bestimmt (Tabelle 57).

Tabelle 57: Stabilitätsprüfung der Cartridges von Ceftazidim. Lagerung bei 4°C und 40°C über 7 Tage.

	Tag 0 ng/mL	Tag 7 40°C ng/mL	Akzeptanzkriterium 100 ± 20%
P1	1120,00	1080,00	passed
P2	543,00	520,50	passed
P3	398,50	367,00	passed
P4	608,00	689,00	passed

P5	232,50	240,00	passed
P6	287,00	277,50	passed
Kontrolle 1	87,75	104,50	passed
Kontrolle 2	837,50	836,50	passed

Linezolid

Die Lagerung der Linezolid Cartridges erfolgte ebenfalls bei 40 °C. Nach der siebentägigen Aufbewahrung der Cartridges bei 40 °C ist der DRG:HYBRiD-XL noch in der Lage, mit diesen Cartridges die Proben und Kontrollen in den erwarteten Konzentrationsbereichen adäquat zu messen.

Diese Stabilität der Cartridges bei 40 °C im Rahmen dieser beschleunigten Haltbarkeitsprüfung lässt auf eine Langzeithaltbarkeit von 1 Jahr hindeuten (Magari, et al., 2004). Die tatsächliche Haltbarkeit des Assays lässt sich abschließend erst nach der Durchführung der Echtzeit-Haltbarkeitsprüfung bestimmen. Diese läuft über 30 Monate und kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden.

Die Haltbarkeit für die Assays wird zunächst auf 12 Monate festgelegt.

Tabelle 58: Stabilitätsprüfung der Cartridges von Linezolid nach 7 Tagen bei 40°C. Als Referenz wird die Messung des Tag 0 herangezogen.

	Tag 0	Tag 7 40 °C	Akzeptanzkriterium 100 ± 20 %
P1	840,00	736,50	passed
P2	638,00	750,00	passed
P3	769,00	712,00	passed
P4	845,50	813,00	passed
P5	1270,00	1375,00	passed
P6	663,50	597,00	passed
Kontrolle 1	233,50	196,00	passed
Kontrolle 2	893,50	735,50	passed

5.7.8.3 Stabilitätsprüfung des gesamten Kits bei Raumtemperatur

Es wurde ein gesamtes Kit bei RT gelagert und nach Tag 1, 7, 14 und 21 mit Proben und Kontrollen vermessen. Diese wurden wie in 4.2.12.10.4 beschrieben mit bei 2 – 8 °C (4 °C) gelagerten Cartridges verglichen. Der Akzeptanzbereich liegt bei einer Abweichung von 20 %, somit sind Wiederfindung von 80,0- 120,0 % nötig zum Bestehen.

Ceftazidim

Die Lagerung der Ceftazidim Reagenzien bei Raumtemperatur stellt für 14 Tage kein Problem dar. Die Wiederfindung nach 14 Tagen erfüllt alle Akzeptanzkriterien.

Die Messung an Tag 21 zeigte allerdings höhere Werte für die Proben und Kontrollen. In diesem Fall schreibt die Verfahrensanweisung vor, eine Rekalibrierung mit den gestressten, in diesem Fall bei Raumtemperatur gelagerten, Cartridges und Rekalibratoren durchzuführen. Die Rekalibrierung war erfolgreich und alle Proben, sowie Kontrollen wurden innerhalb der geforderten Akzeptanzkriterien gefunden (Tabelle 59).

Eine Lagerung bei Raumtemperatur für 14 Tagen stellt kein Problem dar, sollte das Kit für länger als zwei Wochen bei Raumtemperatur gelegen haben und wurde zuvor schon verwendet, so sollte eine Rekalibrierung des Gerätes durchgeführt werden.

Generell ist eine Lagerung von 21 Tagen bei Raumtemperatur möglich, wenn anschließend eine Rekalibrierung durchgeführt wird.

Tabelle 59: Stabilitätsprüfung des Ceftazidim Assays bei Raumtemperatur. Grau hinterlegte Felder weisen auf ein nicht bestehen der Akzeptanzkriterien hin.

	Tag 0	Tag 14 RT	Tag 21 RT	Tag 21 RT nach Rekalibrierung	Akzeptanzkriterium 100 ± 20 %
P1	1155,00	1085,00	1300,00	957,50	924,00 – 1386,00
P2	562,00	646,00	673,00	507,00	449,60 – 674,40
P3	407,50	414,00	499,50	339,00	307,20 – 460,80
P4	686,00	746,00	815,50	593,00	548,80 – 823,30
P5	226,00	264,00	317,50	211,00	204,40 – 306,60
P6	290,00	333,00	333,00	337,50	232,00 – 348,00
Kontrolle 1	92,65	82,45	108,00	86,40	74,12 – 111,18
Kontrolle 2	887,50	1085,00	1110,50	760,50	736,80 – 1105,20

Linezolid

Eine Lagerung des Linezolid-Kits bei Raumtemperatur hat keinen negativen Einfluss auf die Messung der sechs Proben und zwei Kontrollen. Nach drei Wochen Lagerung bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) wurden alle Proben in den Akzeptanzkriterien gefunden.

Eine Lagerung bei Raumtemperatur ist für die Kits über einen Zeitraum von drei Wochen möglich.

Tabelle 60: Ergebnisse der Stabilitätsprüfung des Linezolid Assays bei Raumtemperatur. Gezeigt ist die Messung an Tag 0, sowie die Messung an Tag 21. Durchgeführt wurde die Messung am DRG:HYBRiD-XL.

	Tag 0	Tag 21 RT	Akzeptanzkriterium 100 ± 20 %
P1	13.350,00	10.950,00	10.680,00 – 16.020,00
P2	7700,00	7820,00	6160,00 – 9240,00
P3	8235,00	8015,00	6588,00 – 9882,00
P4	9140,00	8935,00	7312,00 – 10.968,00
P5	4145,00	3715,00	3316,00 – 4974,00
P6	7210,00	6540,00	5768,00 – 8652,00
Kontrolle 1	243,50	224,00	194,80 – 292,20
Kontrolle 2	814,00	833,50	651,20 – 976,80

Generell sollten die Kits aber immer entsprechend den Herstellerangaben bei 2 – 8 °C gelagert werden.

5.7.8.4 On-Board-Stabilität der Rekalibratoren und Kontrollen

Mit der On-Board-Stabilität wird geprüft, wie lange die Kontrollen und Rekalibratoren im Gerät verbleiben können, ohne dass sie einen negativen Einfluss auf die Richtigkeit haben.

Ceftazidim

Die Rekalibratoren und Kontrollen des Ceftazidim Assays wurden im Vorfeld gelöst.

Nach einer Lagerung von 24 h im DRG:HYBRiD-XL erfüllen die gemessenen Konzentrationen noch die Akzeptanzkriterien. Verbleiben die Reagenzien noch weitere 24 h auf dem Gerät, sieht man einen Konzentrationsverlust. Die Kontrolle 1 erfüllt ab diesem Zeitpunkt nicht mehr die Akzeptanzkriterien (Tabelle 61).

Das Verbleiben der Kontrollen und Rekalibratoren im Gerät ist für 24 h möglich, darüber hinaus muss eine neue Rekalibrierung des Assays durchgeführt werden, um eine akkurate Messung zu garantieren.

Tabelle 61: Ergebnisse der Stabilitätsprüfung der Lagerung der Rekalibratoren und Kontrollen des Ceftazidim Assays im Gerät für 48h.

	Zeitpunkt 0h ng/mL	Zeitpunkt 24 h ng/mL	Zeitpunkt 48 h ng/mL	Akzeptanzkriterium 100 ± 15 %
Kontrolle 1	85,70	83,35	71,45	72,86 -98,56
Kontrolle 2	817,00	818,00	775,50	694,45 – 939,55
Rekalibrator 1	81,65	86,25	78,50	69,40 – 93,90
Rekalibrator 2	823,00	839,00	822,00	699,55 – 946,45

Linezolid

Da die Kontrollen und Rekalibratoren des Linezolid-Assays gebrauchsfertig sind, werden diese direkt in das Gerät gestellt. Nach der neuen Abarbeitung dieses Versuches wird eine häufigere Messung gefordert. So wurden immer zwei Messungen pro Tag durchgeführt. Bis zum Zeitpunkt 32 h wurden die gemessenen Reagenzien in den Akzeptanzkriterien gefunden. Bei der Messung nach 48 h konnte keine der Proben mehr im Akzeptanzbereich gefunden werden. Sie waren einheitlich zu hoch.

Es ist somit möglich, die Kontrollen, sowie die Rekalibratoren des Linezolid Assay für 32 h im Vollautomaten zu belassen (Tabelle 62). Eine längere Lagerung schadet den Reagenzien und somit der Richtigkeit des Assays.

Tabelle 62: Stabilitätsprüfung der Lagerung der Rekalibratoren und Kontrollen des Linezolid Assays im Gerät für 48h.

	Zeitpunkt 0 ng/mL	Zeitpunkt 32h ng/mL	Zeitpunkt 48 h ng/mL	Akzeptanzkriterium 100 ± 15 %
Kontrolle 1	233,00	255,00	333,00	198,05 – 267,95
Kontrolle 2	817,50	938,00	1505,00	694,88 – 940,13
Rekalibrator 1	232,00	264,00	318,50	197,20 – 266,80
Rekalibrator 2	854,00	920,50	1085,00	725,90 – 982,10

5.7.8.5 Stabilitätsprüfung nach Transportsimulation

Die Prüfung der Stabilität nach der Transportsimulation erfolgt direkt nach der Simulation und erneut nach der Lagerung der gestressten Kits nach einem Jahr. So soll geprüft werden, ob Assays, die einen 5-tägigen Transport hinter sich haben, bei dem sie verschiedenen Temperaturen ausgesetzt sind, noch funktionsfähig sind und richtige Ergebnisse liefern. Die Messung wird nach einem Jahr erneut durchgeführt, um zu prüfen, ob der Transport später die Stabilität beeinflusst. So ist gewährleistet, dass auch nach dem langen Transport die Haltbarkeit von einem Jahr gesichert ist.



Wie in 4.2.12.10.6 beschrieben, werden die 6 Verlaufsproben und die Kontrollen gemessen. Die Verdünnung der Proben wurde automatisch auf dem Gerät durchgeführt.

Ceftazidim

Für den Ceftazidim Assay wurden die Kontrollen und Rekalibratoren als Lyophilisat gestresst und vor der Messung gelöst. Die in Tabelle 63 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass die Lagerung bei verschiedenen Temperaturen, 37 ° und 4 °C sowie Raumtemperatur (20 - 25 °C), keinen Einfluss auf die Richtigkeit des Tests haben. Auch nach der weiteren Lagerung von einem Jahr nach der Transportsimulation misst das zuvor gestresste Kit noch genauso akkurat, wie das nach Arbeitsanleitung bei 4 °C gelagerte Kit. Das Akzeptanzkriterium von  $\pm 20 \%$  wurde für alle gemessenen Proben und Kontrollen erfüllt.

Tabelle 63: Transportstabilität des Ceftazidim-Kits direkt nach der Transportsimulation und der Lagerung weiterer 12 Monate.

	Lagerung 4°C ng/mL	nach Transportsimulation ng/mL	Wiederfindung zu 4°C %
P1	940,00	1035,00	100 %
P2	494,50	504,50	101 %
P3	363,50	389,00	110 %
P4	630,50	652,50	101 %
P5	196,50	217,00	101 %
P6	302,50	276,50	97 %
Kontrolle 1	71,50	66,55	101 %
Kontrolle 2	782,50	772,50	99 %
	12 Monate Lagerung 4°C ng/mL	12 Monate nach Transportsimulation ng/mL	Wiederfindung zu 4°C %
P1	1037,22	1100,43	106 %
P2	569,14	560,39	98 %
P3	420,91	449,24	107 %
P4	573,98	668,49	116 %
P5	294,34	259,78	88 %
P6	366,50	328,42	90 %
Kontrolle 1	90,50	89,50	99 %
Kontrolle 2	904,00	806,09	89 %

Linezolid

Der Linezolid Assay wurde samt den gebrauchsfertigen Kontrollen und Rekalibratoren der Transportsimulation unterzogen. Die Messung der sechs Proben und Kontrollen war nach der Transportsimulation innerhalb der Akzeptanzkriterien. Auch nach einem Jahr Lagerung der zuvor durch die Transportsimulation gestressten Kits ist eine sehr gute Wiederfindung der Proben gewährleistet (Tabelle 64).

Tabelle 64: Ergebnisse der Messung der Stabilität des Linezolid-Kits direkt nach der Transportsimulation und der Lagerung weiterer 12 Monate. Messung erfolgte mit dem DRG:HYBRiD-XL

	Lagerung 4°C ng/mL	nach Transportsimulation ng/mL	Wiederfindung zu 4°C %
P1	10.950,00	11.000,00	100 %
P2	7235,00	7325,00	101 %
P3	3520,00	3855,00	110 %
P4	3710,00	3730,00	101 %
P5	3410,00	3435,00	101 %
P6	5630,00	5465,00	97 %
Kontrolle 1	196,50	199,00	101 %
Kontrolle 2	805,50	801,00	99 %
	12 Monate Lagerung 4°C ng/mL	12 Monate nach Transportsimulation ng/mL	Wiederfindung zu 4°C %
P1	10.235,48	9940,04	97 %
P2	8079,06	7784,03	96 %
P3	4425,40	4855,46	110 %
P4	5220,06	5024,91	96 %
P5	3961,77	4166,78	105 %
P6	6515,03	6831,80	105 %
Kontrolle 1	234,80	221,69	94 %
Kontrolle 2	862,46	823,44	95 %

Es ist davon auszugehen, dass ein suboptimaler Transport, bei dem die Kühlung der Kits nicht gewährleistet werden kann, die Qualität der beiden Assays nicht direkt nach dem Transport oder auch nach längerer Lagerung von bis zu 12 Monaten beeinflusst.

## 5.8 Validierung

### 5.8.1 Bestimmung von Referenzwerten mit Proben gesunder Individuen

Für die Validierung der Assays ist es wichtig, dass ein Einfluss der nativen Probe geprüft wird. In der Prüfung der Spezifität des Assays wurden viele verschiedene strukturähnliche Antibiotika auf eine mögliche Interferenz zu den Assay Komponenten geprüft. Da aber jeder Mensch individuell ist, wurden 75 Proben für den Analyten negative von gesunden Spendern auf eine Interferenz zu den Assays geprüft. Die Proben stammen aus der DRG-Bio-Bank. Die Proben setzten sich aus 36 männlichen und 39 weiblichen Spendern zusammen. Alter und ethnische Herkunft der Spender wurde nicht berücksichtigt.

Die Proben wurden aufgrund der großen Anzahl vor der Assay Durchführung am DRG:HYBRiD-XL manuell vorverdünnt.

#### Ceftazidim

Nach der 1:100 Verdünnung der Proben für den Ceftazidim-Assay auf dem Vollautomaten wurden diese in zwei Läufen gemessen. Kontrollen wurden zu Verifizierung des Laufes mitgeführt. Anschließend wurden die Werte durch die Errechnung von Perzentilen bewertet. Es ist zu beobachten, dass die Proben der weiblichen Spenderinnen höher gemessen werden als die der männlichen. Dies betrifft aber nur 5 % der gemessenen Proben. Die 95 % Perzentile ist für die 75 Proben beider Geschlechter fast identisch (Tabelle 65).

Tabelle 65: Messung von 75 Proben von Gesundspendern (männlich und weiblich) mit dem Ceftazidim-Assay auf dem Hybrid nach manueller Vorverdünnung der Probe.

	Männer	Frauen	Gesamt
Anzahl	36	39	75
97,5% Perzentile	9,25	13,40	11,32
95% Perzentile	7,28	7,25	7,39
5% Perzentile	0,00	0,00	0,00
2,5% Perzentile	0,00	0,00	0,00
Mittelwert ng/mL	0,88	1,25	1,07
Median ng/mL	0,00	0,00	0,00
Min Konz ng/mL	0,00	0,00	0,00
Max Konz ng/mL	11,00	19,00	19,00

Die Gesamtheit der Proben zeigt einen Mittelwert von 1,07 ng/mL. Der Median beträgt allerdings 0 ng/mL. Der LOB des Assays beträgt 4,76 ng/mL. Dieser Wert stellt wie oben die Rauschgrenze des Assays dar. Dieser wird als kritischer Wert angesehen und ist der höchste Messwert, der mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit für ein Negativmaterial beobachtet werden kann.

Es ist nicht davon auszugehen, dass eine Interferenz bei der Messung negativer Serumproben besteht. Die Messgrenze des Assays kann mit dem LOQ bestätigt werden. Dieses liegt bei 22,03 ng/mL (5.7.3). Der Messbereich des Assay sollte von 22,03 bis 2000 ng/mL festgelegt werden.

### Linezolid

Nach der Vorbereitung der Proben mit einer 1:10 Vorverdünnung der Proben. Anschließend wurde die Messung auf dem Linezolid-Assay auf dem DRG:HYBRiD-XL durchgeführt. Kontrollen werden jeweils mitgeführt.

Es ist zu beobachten, dass die Proben der weiblichen Spender höher gemessen werden als die der männlichen. Dies betrifft aber auch durch alle Perzentile hinweg gemessenen Proben. Selbst in der 2,5 % Perzentile ist noch keine Annäherung der Werte zu sehen (Tabelle 66). Bisher konnte für dieses Phänomen keine Erklärung gefunden werden. Der Mittelwert aller gemessenen Proben beträgt 58,47 ng/mL. Der Median beträgt 32,20 ng/mL. Da die Messung der weiblichen Proben aber deutlich höhere Werte liefert, sollte in diesem Fall die 95 % Perzentile aller Proben als Grenze des Assays angenommen werden. Die Proben wurden im Vorfeld 1:10 verdünnt, sodass, um eine Vergleichbarkeit mit dem ermittelten LOQ herzustellen, eine Division des Ergebnisses der Probenmessung mit diesem Faktor erfolgen muss. Folglich liegt die 95 % Perzentile bei

20,97 ng/mL. Der LOQ des Linezolid Assays beträgt 16,98 ng/ml. Da die negativen zu bewertenden Proben aber über dem LOQ gemessen werden, sollte die untere Messgrenze des Assays nach oben korrigiert werden.

Die Proben, die kein Linezolid enthalten sollten und trotzdem als positiv durch den Test bewertet werden, weisen auf eine Interferenz des Assays mit Serumproben hin. Der LOB und auch LOD wurden im Vorfeld mit Standardmaterial bestimmt, welches aus der Standardmatrix (Phosphatpuffer) und Linezolid besteht. Serumproben haben zwar auch einen hohen Wasseranteil, allerdings sind auch Proteine wie Albumine und verschiedene Mengen an Globulinen in der Probe vertreten.

Die zuvor durchgeführte Bestimmung des Probenotyps (5.7.1) wurde ausschließlich mit Proben, die Linezolid enthalten durchgeführt. Dieser Effekt der Interferenz scheint durch die höhere Affinität zum verfügbaren Linezolid zu verschwinden.

Um auch die richtige Messung von negativen Serumproben zu gewährleisten, wurde die untere Messgrenze des Linezolid Assays auf 20,97 ng/mL angehoben. Dies entspricht der 95 % Perzentile. Der Messbereich des Linezolid Assays sollte somit 20,97 – 4000 ng/mL festgelegt werden.

Langfristig, und auch für die Entwicklung weiterer Assays in diesem Bereich der Antibiotika-Assays, sollten negative Serumproben verwendet werden, um den Test einzustellen. Da diese Ungenauigkeit anscheinend nur bei negativem Material auftritt sollte auch über die Änderung der Nullstandards zu Serummaterial nachgedacht werden.

Tabelle 66 Messung von 75 Proben von Gesundspendern (männlich und weiblich) mit dem Linezolid-Assay auf dem Hybrid nach manueller Vorverdünnung der Probe.

	Männer	Frauen	Gesamt
Anzahl	36	39	75
97,5 % Perzentile	63,20	220,25	217,75
95 % Perzentile	58,96	217,75	209,66
5 % Perzentile	0,90	6,21	0,99
2,5 % Perzentile	0,81	1,57	0,77
Mittelwert ng/mL	21,98	94,00	58,47
Median ng/mL	11,00	72,40	32,20
Min Konz ng/mL	0,00	0,00	0,00
Max Konz ng/mL	74,00	248,00	248,00

### 5.8.2 Methodenvergleich

Der Verwendungszweck der Assays ist die quantitative Bestimmung der Antibiotika im Serum. Dafür wird bisher die LC-MS oder HPLC verwendet. Durch einen Methodenvergleich soll gezeigt werden, dass eine antikörperbasierte Methode wie der ELISA äquivalente Ergebnisse zur LC-MS liefern kann.

Für die Probenbeschaffung und die LC-MS Messung wurde eine Kooperation mit dem Labor Dr. Brunner in Konstanz und der Ludwig-Maximilian-Universität in München eingegangen.

#### Ceftazidim

Für die vergleichende Messung der Ceftazidim- haltigen Proben wurden 27 Serumproben eingesetzt. Die Messung erfolgte mit vorheriger automatischer Verdünnung auf dem DRG:HYBRiD-XL.

Die Proben im Bereich von 23 – 1345 ng/mL zeigten im Mittelwert Abweichung von der LC-MS von 13,71 % gemessen. Wie in Abbildung 52 zu sehen ist, ergibt sich innerhalb der Messung eine gute Korrelation zu den Konzentrationen, die in der LC-MS bestimmt wurden. Eine Trendlinie mit der Gleichung von  $y=25,17 + 1,069x$  führt gleichmäßig durch die Messpunkte.

Im Bland Altman Plot (Abbildung 53) ist zu erkennen, dass die meisten Messungen über den gesamten Konzentrationsbereich einen höheren Wert zeigen als in der LC-MS. Es lässt sich aber kein Zusammenhang mit einem bestimmten Messbereich ausmachen.

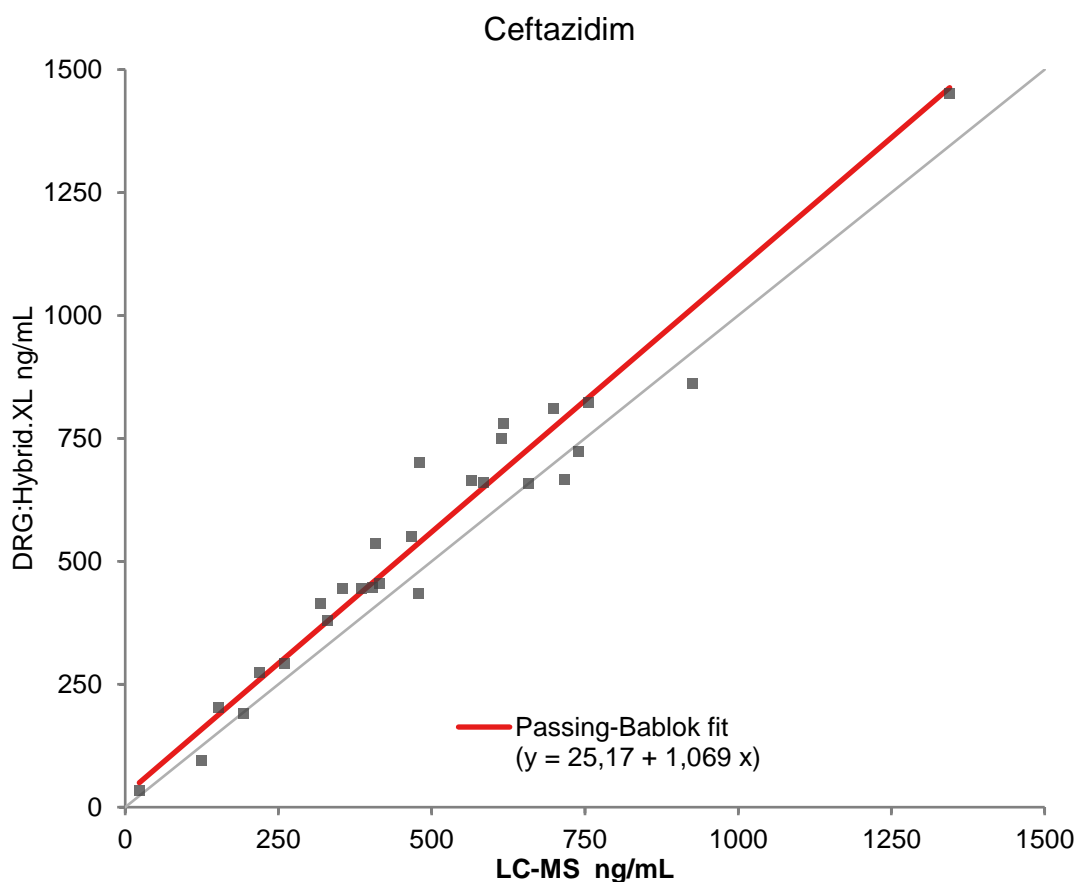


Abbildung 51: grafische Darstellung der Korrelation der vergleichenden Messung von 27 Proben auf dem DRG:HYBRID-XL und der LC-MS LMU, München. Eine Trendlinie mit angegebener Steigung gibt das Maß der Korrelation an.

Für das Ceftazidim gibt es keine bekannten Metabolite, die noch aktiv im Blut vorliegen (Li et al., 2020). Die Elimination des Arzneistoffs erfolgt zu 90 bis 96 % renal. Bei einer Niereninsuffizienz ist die Plasmahalbwertszeit deutlich verlängert, was eine Dosisanpassung erforderlich macht. Eine Metabolisierung in der Leber erfolgt nicht. Aus diesen Gründen kann es sein, dass verbleibendes, schon metabolisiertes Ceftazidim vom im Test verwendeten Antikörper erkannt werden kann. Dieses ist zwar nicht mehr antimikrobiell wirksam, aber in Teilen vorhanden. Im Vergleich zu der LC-MS, wo eine Probenvorbereitung in mehreren Schritten der Messung vorangeht, wird in der Testdurchführung auf dem DRG:HYBRID-XL lediglich eine Probenverdünnung durchgeführt.

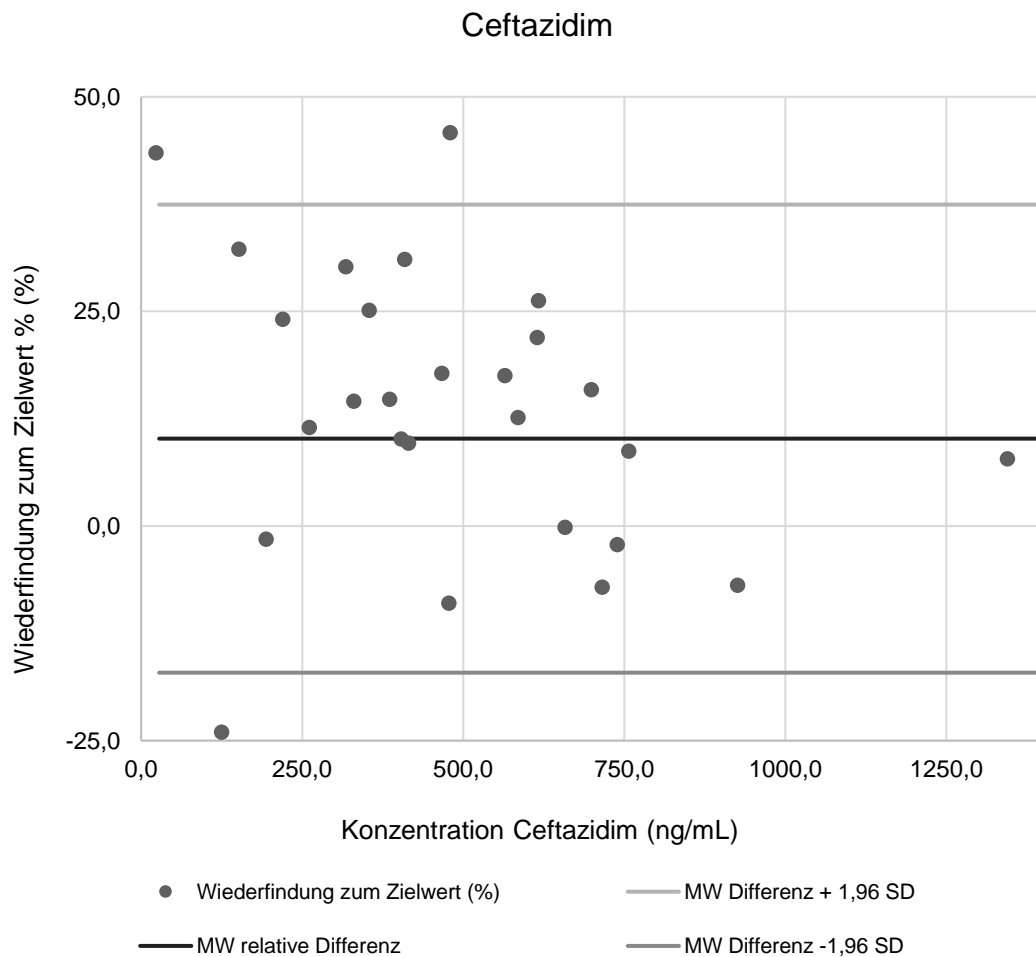


Abbildung 52: Bland-Altman-Plot der Ergebnisse des Methodenvergleichs für Ceftazidim.

Da keine weiteren Werte der Patienten vorliegen, die auf eine Niereninsuffizienz hindeuten, bleibt diese Vermutung nur Spekulation. Allerdings ist festzuhalten, dass rund 50 % der Patienten, die an einer Sepsis leiden, auch eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion haben (Bagshaw et al., 2009).

Zusätzlich ist aber auch zu erwähnen, dass diese Abweichung auch durch eine nicht optimale Kalibrierung des Gerätes verursacht werden kann.

Abschließend ist aber festzuhalten, dass auf Grundlage der Daten aus dem Methodenvergleich eine gute Vergleichbarkeit gegenüber der LC-MS gewährleistet ist. Die Abweichung von 13 % hat keinen Einfluss auf die klinische Aussage, die mit diesem Test getroffen wird.

### Linezolid

Die Vergleichsprobenmessung für den Linezolid-Assay wurde mit der LMU München durchgeführt. Die dort verwendete Methode der LC-MS wurde zuvor mit dem Labor Dr. Brunner in Konstanz verglichen, um keine Abweichungen zwischen den Messmethoden zu übersehen. Die Vergleichbarkeit der beiden LC-MS Methoden lag bei 101 %. Die Messmethoden sind also sehr gut vergleichbar.

40 bereitgestellte Serumproben von Intensivstationspatienten wurden auf dem Hybrid automatisch 1:10 verdünnt und gemessen. Die Messung der Vergleichsproben zeigte eine Wiederfindung von durchschnittlich 95,6 %. Die Korrelation der Proben zu den in der LC-MS bestimmten Konzentrationen ist durch die Trendlinie in

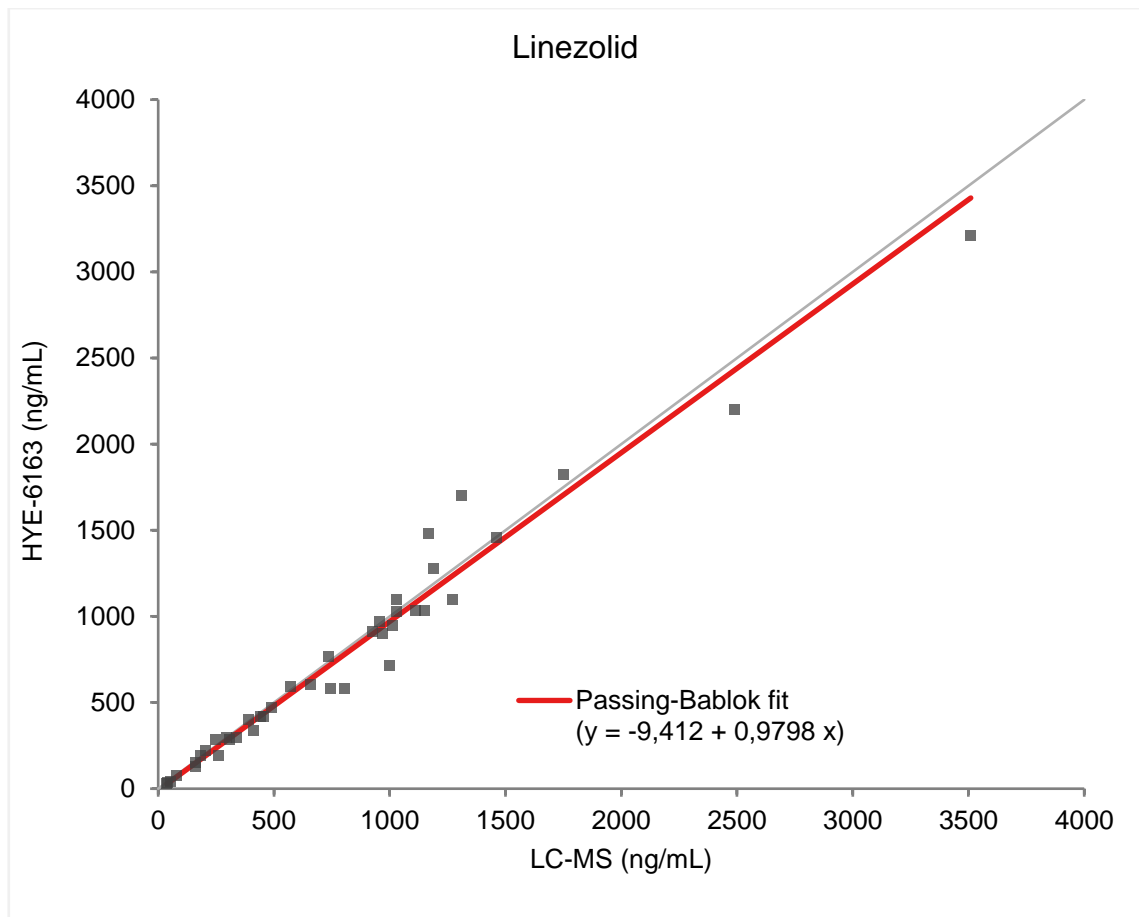


Abbildung 53 veranschaulicht. Die Steigung der Linie von  $0,958x$  deckt sich gut mit den Ergebnissen des berechneten Korrelations Koeffizienten, der bei  $0,98$  liegt.



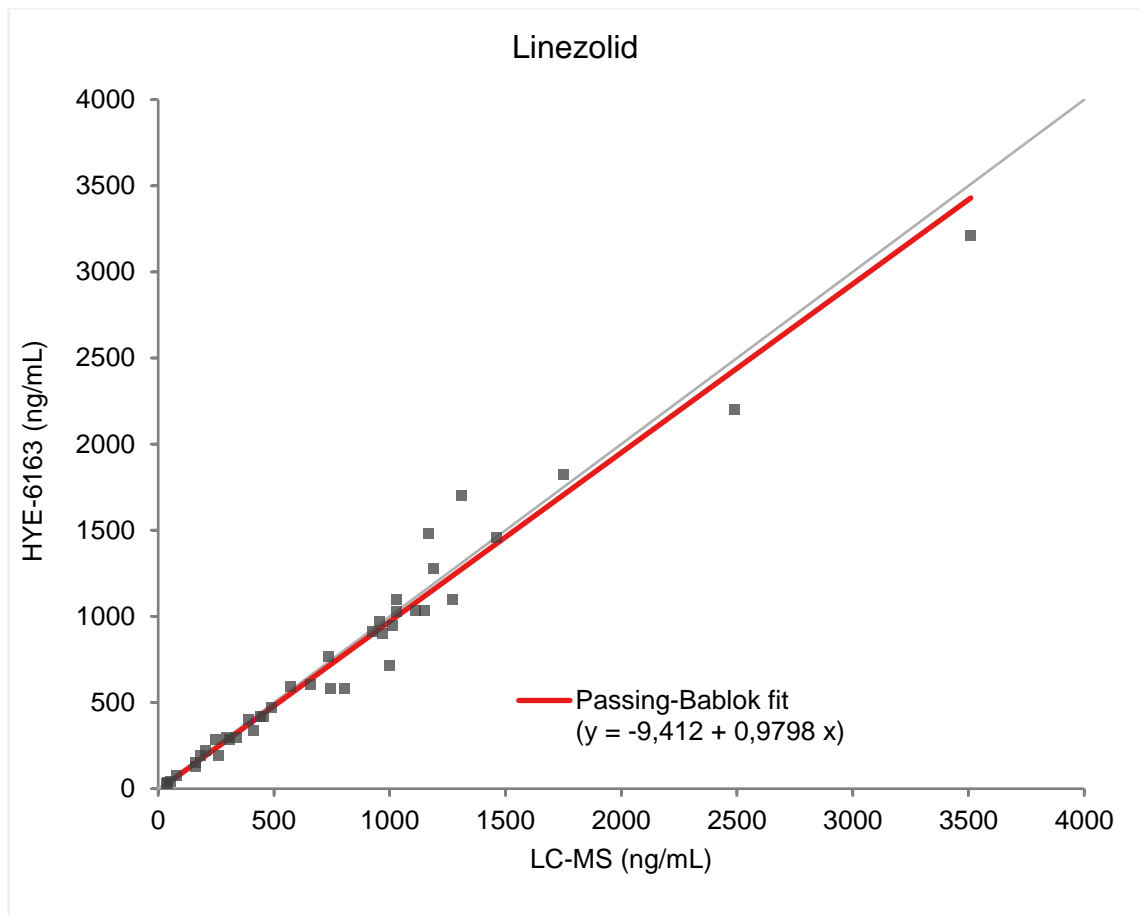


Abbildung 53: Passing-Bablok Korrelation der vergleichenden Messung von 40 Proben auf dem DRG.HYBRID-XL und der LC-MS an der LMU in München. Eine Trendlinie mit angegebener Steigung gibt das Maß der Korrelation an.

Die Auswertung mit dem Bland-Altman Blot (Abbildung 55) zeigt eine deutliche Streuung der Ergebnisse. Da die Inhomogenität der Ergebnisse nicht auf einen speziellen Messbereich begrenzt ist, ist nicht von einer falschen Messung des Tests auf dem Vollautomaten durch eine nicht gut eingestellte Standardkurve auszugehen.

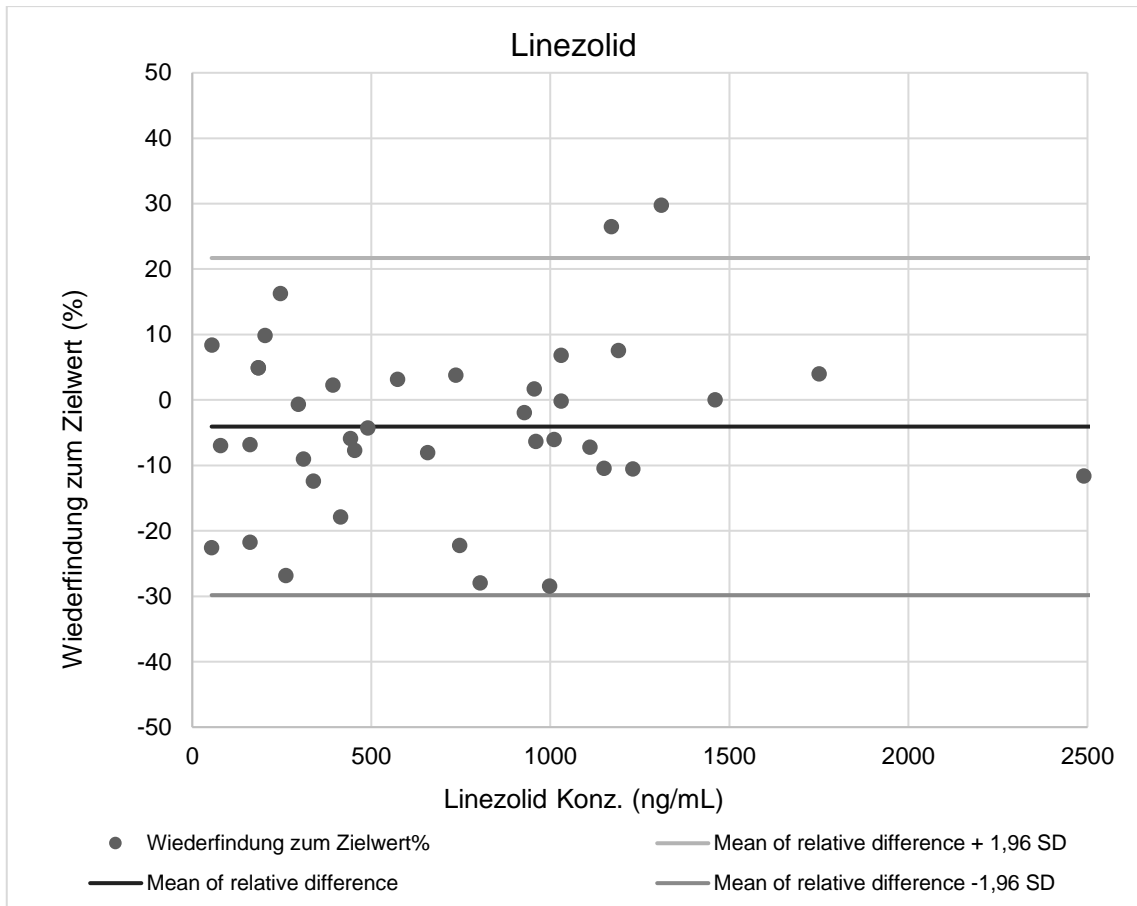


Abbildung 54: Bland-Altman- Plot Methodenvergleichs für Linezolid.

Vielmehr sollte der Fokus auch bei diesem Assay auf den Gesundheitszustand des Patienten, sowie die, den Metabolismus beschreibenden Parameter gelegt werden. Die Daten zu dem Kreatin und der Clearance Rate sind aus Datenschutzgründen nicht abrufbar. Allerdings wird in der Fachinformation des Arzneimittels ZYVOXID® (PHARMACIA GmbH, 2007) beschrieben, wie mit Patienten zu verfahren ist, die an einer Niereninsuffizienz leiden.

So heißt es, dass eine Dosisanpassung bei Patienten mit einer Creatinin-Clearance von <30 ml/min nicht nötig sei. Trotzdem gelte aber, dass bei der bis zu 10-fach höheren Konzentration der beiden Hauptmetabolite und deren unsichere klinische Bedeutung Vorsicht bei der Behandlung eben dieser Patienten gegeben ist (French, 2003; Paolo et al., 2010).

Linezolid wird in die zwei inaktiven Hauptmetabolite verstoffwechselt, einem Aminoethoxyessigsäure-Metaboliten (Metabolit A) und einem Hydroxyethylglycin-Metaboliten (Metabolit B) (Brier et al., 2003). Die Oxidationswege vom Linezolid zu diesen beiden Metaboliten sind bisher schlecht beschrieben.

Die Metabolite werden später zu 10-40 % der ursprünglichen Dosis ausgeschieden (Brier et al., 2003; Manfredi, 2006).

Wenn davon auszugehen ist, dass diese 10- 40% der Metabolite zunächst im Körper verbleiben, lässt sich nachvollziehen, wie es zu den höheren Werten mancher Proben kommen kann.

Vermutlich sind dies Patienten, die auf Grund der Schwere ihrer Krankheit oder Vorerkrankung eine eingeschränkte Nierenfunktion haben und somit Schwierigkeiten haben das Antibiotikum aus dem Körper zu eliminieren (Souza et al., 2020).

Zusätzlich spielen auch Faktoren wie das Alter der Patienten eine große Rolle (Meyer, 1989). Um dies nachzuweisen, könnte zum einen eine Korrelation zwischen Creatinin-Clearance und ermittelten Linezolid Wert erstellt werden. Zum anderen wäre es möglich, definiert abgebautes Linezolid, welches der Struktur von Metabolit A oder B entspricht auf dem Assay zu testen. Dieser These nach müsste die Wiederfindung dieses Materials in einem gewissen Prozentsatz möglich sein.

## 6 Fazit und Ausblick

Die Entwicklung eines Tests zur Antibiotika-Konzentration Kontrolle im Serum und Plasma von Intensivstationspatienten ist abschließend als erfolgreich zu bewerten.

Es konnte für die Antibiotika Ceftazidim und Linezolid gezeigt werden, dass es möglich ist, einen antikörperbasierten Assay zu entwickeln, der es möglich macht, eine kostengünstigere Alternative zur bisherigen Standardmethode LC-MS oder HPLC zu bieten.

Die Notwendigkeit des Antibiotic- Stewardship wird mittlerweile auf allen Ebenen der Gesundheitspolitik weltweit anerkannt. Dazu gehören die Weltgesundheitsorganisation (WHO), das Europäische Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC). Auch nationale Gesundheitsinstitutionen wie das Robert-Koch Institut unterstützen dieses Vorhaben. Das Hauptziel der des Antibiotic- Stewardship ist es, Infektionen oder Todesfälle durch resistente Bakterien zu verhindern oder zu reduzieren. Dem geht eine Dezimierung resistenter Bakterien bei Individuen oder in der sie umgebenden Umwelt voraus. Dies wird wiederum durch die Reduzierung des Antibiotikaeinsatzes unterstützt: Niedrigere und gezieltere Dosen von Antibiotika reduzieren Resistenzen und können somit zu weniger Erkrankungen und Todesfälle. In Deutschland wurde 2015 die Deutsche Antimikrobielle Resistenzstrategie (DART 2020) auf die politische Agenda gesetzt (Akademie für Infektionsmedizin e.V., 2018). Beispielsweise hat die Bundesärztekammer ein ABS-Schulungskonzept entwickelt (Bundesärztekammer, 2017).

Das Verbundprojekt „DiabKON“ – Diagnostischer Test für die rationale Antibiotika-Therapie-Kontrolle, in Rahmen dessen auch diese Promotionsarbeit entstanden ist, wird gefördert durch

das Bundesministerium für Bildung und Forschung in der Fördermaßnahme „KMU-innovativ: Medizintechnik“ (FKZ 13GW0354 A-F).

Durch die Möglichkeit der automatisierten Abarbeitung der Assays mit dem DRG:HYBRID-XL wird die Messung ohne erhöhten Personalaufwand ermöglicht.

Die zuvor im Design- Input festgelegten Ziele der Entwicklung konnten eingehalten werden. Die Sensitivität der Assays ist im Vergleich zu der LC-MS deutlich höher. So liegt die Grenze der Sensitivität für Linezolid- Messung auf dem Vollautomaten bei 16,98 ng/mL und für Ceftazidim einer Konzentration von 22,03 ng/mL und entspricht somit den Anforderungen (5.7.3). Auch die in der Vorhabensbeschreibung zum Verbundprojekt „DiabKON“ festgelegten Sensitivitäten der Assays von 2 µg/mL für Linezolid und 0,5 µg/mL für Ceftazidim konnten erfüllt werden.

In der klinischen Praxis wird die Konzentration der Antibiotika in mg/L gemessen, was µg/mL entspricht. Der Vollautomat kann dementsprechend die Ergebnisse in mehreren Einheiten ausgeben.

Tabelle 67: Vergleich der Sensitivität der Messung der LC-MS und der Methode auf dem DRG:HYBRID-XL in ng/mL.

Substanz	Messgrenze der LC-MS- Methode Labor Dr. Brunner Konstanz	LOQ DRG:HYBRID-XL
Linezolid	0,40 µg/mL = 400,00 ng/mL	16,98 ng/mL
Ceftazidim	0,80 µg/mL = 800,00 ng/mL	22,03 ng/mL

Die Assays erfüllen auch alle weiteren Anforderungen an die Messgenauigkeit und Wiederfindung der Proben, die laut den CLSI-Guidelines zu erfüllen sind.

Die Entwicklung dieser Assays weist allerdings auch darauf hin, dass im Patientenblut zusätzlich zum intakten Antibiotikum auch Metabolite vorhanden sind, welche durch die LC-MS Messung nicht erfasst werden.

Aufgrund ihrer oft sehr ähnlichen chemischen Struktur zum intakten Antibiotikum werden diese Metabolite jedoch von den im Immunoassay eingesetzten Antikörpern erfasst. Dies kann, wie am Beispiel des Linezolid deutlich wird, bis zu 20 % der Menge an intaktem Linezolid betragen. Dies birgt Vor- und Nachteile. Zum einen wird die Gesamtmenge des im Körper vorhandenen Antibiotikums deutlich, was in Bezug auf mögliche Nebenwirkungen eine interessante Größe darstellen könnte. Gerade wenn ein Patient die Behandlung nicht gut verträgt, sollte auch die Gesamtmenge des Antibiotikums im Patienten betrachtet werden. Des Weiteren kann der Testanwendung in klinischen Studien finden, in denen die Belastung des Patienten durch Metabolite von Antibiotika betrachtet wird oder die Akkumulation dieser im Verlaufe einer Therapie betrachtet wird. Andererseits kann diese Überbestimmung der Proben zu einer verminderten Gabe des Antibiotikums führen.

Zudem wird in der LC-MS Methode eine Probenvorbereitung durchgeführt, somit wird nur intaktes Antibiotikum gemessen. Eine Bestimmung der Metabolite ist nur gesondert möglich.

Bisher wird die Funktion dieser Metabolite nicht weiter betrachtet.

Ziel des ABS ist es auch, die Nebenwirkungen von Antibiotika-Behandlungen zu reduzieren. Im Zusammenhang mit der Antibiotikaeinnahme über einen längeren Zeitraum oder in hohen Dosen gibt es immer wieder Berichte über Nebenwirkungen, die sich als Folgeerkrankung dieser Einnahme manifestieren.

Dabei geht es meist um Verdauungs-assoziierte Erkrankungen, aber auch ein Diabetes kann zur Folge einer Einnahme von Antibiotika werden (Li et al., 2016; Pasko et al., 1985; Shaw et al., 2011). Da diese Studien bisher nicht mit großer Teilnehmerzahl absolviert wurden, ist über die Aussage dieser zu diskutieren (Mikkelsen et al., 2015). Allerdings geben sie deutliche Anhaltspunkte, dass auch die Nebenwirkungen der Antibiotika gemonitort werden sollten.

Vielleicht ist es der Schritt in die richtige Richtung auch die verbleibenden Metabolite der Antibiotika im Körper zu Monitoren und eine Assoziation dieser mit den Nebenwirkungen oder Folgeerkrankungen der Patienten zu prüfen.

## Danksagung

Aufgrund von persönlichen Informationen entfernt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ager, S., & Gould, K. (2012). Clinical update on linezolid in the treatment of gram-positive bacterial infections. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 5, Issue 1, pp. 87–102). <https://doi.org/10.2147/idr.s25890>
- Akademie für Infektionsmedizin e.V. (2018). *S3- Leitlinie Strategien zur Sicherung rationaler Antibiotika-Anwendung im Krankenhaus AWMF-Registernummer 092/001 – update 2018*.
- An, Z. (2010). Monoclonal antibodies - a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. *Protein and Cell*, 1(4), 319–330. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0052-8>
- Bagshaw, S. M., Lapinsky, S., Dial, S., Arabi, Y., Dodek, P., Wood, G., Ellis, P., Guzman, J., Marshall, J., Parrillo, J. E., Skrobik, Y., & Kumar, A. (2009). Acute kidney injury in septic shock: Clinical outcomes and impact of duration of hypotension prior to initiation of antimicrobial therapy. *Intensive Care Medicine*, 35(5), 871–881. <https://doi.org/10.1007/s00134-008-1367-2>
- Bauer, M., Gerlach, H., Vogelmann, T., Preissing, F., Stiefel, J., & Adam, D. (2020). Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019- results from a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, 24(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02950-2>
- Brier, M. E., Stalker, D. J., Aronoff, G. R., Batts, D. H., Ryan, K. K., O’Grady, M., Hopkins, N. K., & Jungbluth, G. L. (2003). Pharmacokinetics of linezolid in subjects with renal dysfunction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2775–2780. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2775-2780.2003>
- Brinkmann, A., Röhr, A. C., Köberer, A., Fuchs, T., Preisenberger, J., Krüger, W. A., & Frey, O. R. (2018). Therapeutisches Drug Monitoring und individualisierte Dosierung von Antibiotika bei der Sepsis: Modern oder nur „modisch“? *Medizinische Klinik - Intensivmedizin Und Notfallmedizin*, 113(2), 82–93. <https://doi.org/10.1007/s00063-016-0213-5>
- Brinkmeier, T., & Frosch, P. J. (2002). Orale antibiotika mit antiinflammatorischer/immunmodulatorischer wirkung für die therapie verschiedener dermatosen. *Hautarzt*, 53(7), 456–465. <https://doi.org/10.1007/s00105-001-0334-4>
- Bundesärztekammer. (2017). *Strukturierte curriculare Fortbildung “Antibiotic Stewardship (ABS)” Rationale Antiinfektivastrategien*.
- Bush, K. (1988). beta-Lactamase Inhibitor from Laboratory to Clinic. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(1), 109–123.

- Bush, K., & Bradford, P. A. (2021). *b -Lactams and b -Lactamase Inhibitors: An Overview. Table 1*.
- BVL. (2012). *Germap 2012*.
- Chiotos, K., Tamma, P. D., & Gerber, J. S. (2019). Antibiotic stewardship in the intensive care unit: Challenges and opportunities. In *Infection Control and Hospital Epidemiology* (Vol. 40, Issue 6, pp. 693–698). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.74>
- Chow, K. M., Hui, A. C., & Szeto, C. C. (2005). Neurotoxicity induced by beta-lactam antibiotics: From bench to bedside. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(10), 649–653. <https://doi.org/10.1007/s10096-005-0021-y>
- Cunha, C. B. (2018). Antimicrobial Stewardship Programs: Principles and Practice. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 102, Issue 5, pp. 797–803). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.04.003>
- Cusumano, J. A., Klinker, K. P., Huttner, A., Luther, M. K., Roberts, J. A., & LaPlante, K. L. (2020). Towards precision medicine: Therapeutic drug monitoring-guided dosing of vancomycin and  $\beta$ -lactam antibiotics to maximize effectiveness and minimize toxicity. In *American Journal of Health-System Pharmacy* (Vol. 77, Issue 14, pp. 1104–1112). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxaa128>
- DRG Instruments GmbH. (2019). *DRG INSTRUMENTS GmbH DRG: HYBRID-XL Bedienungsanleitung*. 1–93.
- Duckett, S. (1999). Ernest Duchesne and the concept of fungal antibiotic therapy. *The Lancet*, 354, 2068–2071.
- Dyar, O. J., Huttner, B., Schouten, J., & Pulcini, C. (2017). What is antimicrobial stewardship? In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 23, Issue 11, pp. 793–798). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.08.026>
- E. Samara, T. F. Moriarty, L. A. Decosterd, R. G. Richards, E. Gautier, & P. Wah. (2017). *Antibiotic stability over six weeks in aqueous solutions at body temperature with and without heat treatment that mimics the curing of bone cement*. 296–306.
- Felden, B., & Cattoira, V. (2018). Bacterial Adaptation to Antibiotics through Regulatory RNAs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(5), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.02503-17>
- Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N. K. J., Hartog, C. S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D. C., & Reinhart, K. (2016). Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193(3), 259–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>
- Fleischmann-Struzek, C., Mellhammar, L., Rose, N., Cassini, A., Rudd, K. E., Schlattmann, P., Allegranzi, B., & Reinhart, K. (2020). Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. In *Intensive Care Medicine* (Vol. 46, Issue 8, pp. 1552–1562). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06151-x>

- Fleischmann-Struzek, C., Schwarzkopf, D., & Reinhart, K. (2022). Sepsis incidence in Germany and worldwide: Current knowledge and limitations of research using health claims data. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin Und Notfallmedizin*, 117(4), 264–268. <https://doi.org/10.1007/s00063-021-00777-5>
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(8), 780–790. <https://doi.org/10.1093/clinids/2.1.129>
- French, G. (2003). Safety and tolerability of linezolid. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 51, Issue SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/jac/dkg253>
- Friedrichs, A., Kramme, E., Weis, S., & Pletz, M. (2020). Antibiotic stewardship: Structure and implementation. *Medizinische Klinik - Intensivmedizin Und Notfallmedizin*, 58(2017), 81–92. <https://doi.org/10.1007/s00063-020-00745-5>
- Fubara, J. O., & Notari, R. E. (1997). A Kinetic Oxymoron: Concentration-Dependent First-Order Rate Constants for Hydrolysis of Ceftazidime. In *American Pharmaceutical Association* (Vol. 87, Issue 1).
- Fuchs, A., Csajka, C., Thoma, Y., Buclin, T., & Widmer, N. (2013). Benchmarking therapeutic drug monitoring software: A review of available computer tools. *Clinical Pharmacokinetics*, 52(1), 9–22. <https://doi.org/10.1007/s40262-012-0020-y>
- Gerabeck, W. E. (2011). Enzyklopädie Medizingeschichte. In *Enzyklopädie Medizingeschichte*. <https://doi.org/10.1515/9783110976946>
- Gey, M. H. (2015). *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik* (3. Auflage). Springer Spektrum.
- Hashemian, S. M. R., Farhadi, T., & Ganjparvar, M. (2018). Linezolid: A review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 1759–1767. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S164515>
- Hermes, J., Markwart, R., Reuß, A., Schmidt, N., Wellhausen, S., & Eckmanns, T. (2019). *Rationaler Antibiotikaeinsatz im ambulanten Sektor*.
- Heuer, H., Solehati, Q., Zimmerling, U., Kleineidam, K., Schloter, M., Müller, T., Focks, A., Thiele-Bruhn, S., & Smalla, K. (2011). Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2527–2530. <https://doi.org/10.1128/AEM.02577-10>
- Hites, M., Taccone, F. S., Wolff, F., Cotton, F., Beumier, M., De Backer, D., Roisin, S., Lorent, S., Surin, R., Seyler, L., Vincent, J. L., & Jacobs, F. (2013). Case-control study of drug monitoring of  $\beta$ -lactams in obese critically ILL patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 708–715. <https://doi.org/10.1128/AAC.01083-12>
- Hüntelmann, A. c. (2006). *Hygiene im Namen des Staates*.
- Huttner, A., Harbarth, S., Hope, W. W., Lipman, J., & Roberts, J. A. (2015). Therapeutic drug monitoring of the  $\beta$ -lactam antibiotics: what is the evidence and which patients should we be using it for? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(12), 3178–3183. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv201>



- Jones, T. E., Selby, P. R., Mellor, C. S., & Cheam, D. B. (2019). Ceftazidime stability and pyridine toxicity during continuous i.v. Infusion. In *American Journal of Health-System Pharmacy* (Vol. 76, Issue 4, pp. 200–205). American Society of Health-Systems Pharmacy. <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxy035>
- Kang, J. S., & Lee, M. H. (2009). Overview of therapeutic drug monitoring. In *Korean Journal of Internal Medicine* (Vol. 24, Issue 1, pp. 1–10). <https://doi.org/10.3904/kjim.2009.24.1.1>
- Kern, J. M. (2015). Multiresistente grampositive Erreger (MRSA, VRE). In *SpringerReference Innere Medizin* (pp. 1–15). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54676-1\\_549-1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54676-1_549-1)
- Kohl, T. O., & Ascoli, C. A. (2017). Immunoassays. *Cold Spring Harbor Protocols*. <https://doi.org/10.1101/pdb.top093690>
- Köhler, W., Schachtel, G., & Voleske, P. (2015). *Biostatistik - Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler* (Vol. 5).
- Levy, M. M., Artigas, A., Phillips, G. S., Rhodes, A., Beale, R., Osborn, T., Vincent, J. L., Townsend, S., Lemeshow, S., & Dellinger, R. P. (2012). Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: A prospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(12), 919–924. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70239-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70239-6)
- Li, J., Lovern, M., Riccobene, T., Carrothers, T. J., Newell, P., Das, S., Talley, A. K., & Tawadrous, M. (2020). Considerations in the selection of renal dosage adjustments for patients with serious infections and lessons learned from the development of ceftazidime-avibactam. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 64, Issue 4). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AAC.02105-19>
- Li, J., Zhu, W., Liu, W., Wu, Y., & Wu, B. (2016). Rifaximin for irritable bowel syndrome: A Meta-Analysis of randomized placebo-controlled trials. In *Medicine (United States)* (Vol. 95, Issue 4). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002534>
- Lima, L. M., Silva, B. N. M. da, Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020).  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 208). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
- Luan, G., & Drlica, K. (2018). Fluoroquinolone-gyrase-DNA cleaved complexes. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1703, pp. 269–281). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7459-7\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7459-7_19)
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2009). Der Experimentor: Immunologie. In *Der Experimentor: Immunologie*. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2196-8>
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2014). *Der Experimentator* (4th ed.). Springer Spektrum.
- MacGowan, A. P. (2003). Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of linezolid in healthy volunteers and patients with Gram-positive infections. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 51, Issue SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/jac/dkg248>

- Magari, R. T., Munoz-Antoni, I., Baker, J., & Flagler, D. J. (2004). Determining Shelf Life by Comparing Degradations at Elevated Temperatures. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *18*(3), 159–164. <https://doi.org/10.1002/jcla.20016>
- Manfredi, R. (2006). Update on the appropriate use of Linezolid in clinical practice. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 455–464.
- Messacar, K., Parker, S. K., Todd, J. K., & Dominguez, S. R. (2017). Implementation of rapid molecular infectious disease diagnostics: The role of diagnostic and antimicrobial stewardship. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(3), 715–723. <https://doi.org/10.1128/JCM.02264-16>
- Meyer, B. R. (1989). Renal Function in Aging. In *IAGS* (Vol. 3).
- Mikkelsen, K. H., Knop, F. K., Frost, M., Hallas, J., & Pottegard, A. (2015). Use of antibiotics and risk of type 2 diabetes: A population-based case-control study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *100*(10), 3633–3640. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2696>
- Montiel-Riquelme, F., Calatrava-Hernández, E., Gutiérrez-Soto, M., Expósito-Ruiz, M., Navarro-Marí, J. M., & Gutiérrez-Fernández, J. (2020). Clinical relevance of antibiotic susceptibility profiles for screening gram-negative microorganisms resistant to beta-lactam antibiotics. *Microorganisms*, *8*(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101555>
- Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. (2016). Deutsche nationale Punkt-Prävalenzerhebung zu nosokomialen Infektionen und Antibiotika-Anwendung 2016. *NRZ-Nationales Referenzzentrum Für Surveillance von Nosokomialen Infektionen*. [http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/pps2016/PPS\\_2016\\_Abschlussbericht\\_20.07.2017.pdf](http://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/pps2016/PPS_2016_Abschlussbericht_20.07.2017.pdf)
- Nosseir, N. S., Michels, G., Pfister, R., Adam, R., Wiesen, M. H. J., & Müller, C. (2014). Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) von Antiinfektiva in der Intensivmedizin. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, *139*(38), 1889–1894. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1387215>
- Oakley, aaron J. (2019). A structural view of bacterial DNA replication. *Protein Science*, *28*, 990–1004.
- O'callaghan, C. H. (1979a). Description and classification of the newer cephalosporins and their relationships with the established compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *5*(6), 635–671. <https://doi.org/10.1093/jac/5.6.635>
- O'callaghan, C. H. (1979b). Description and classification of the newer cephalosporins and their relationships with the established compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *5*(6), 635–671. <https://doi.org/10.1093/jac/5.6.635>
- Okda, F., Lawson, S., Liu, X., Singrey, A., Clement, T., Hain, K., Nelson, J., Christopher-Hennings, J., & Nelson, E. A. (2016). Development of monoclonal antibodies and serological assays including indirect ELISA and fluorescent microsphere immunoassays for diagnosis of porcine deltacoronavirus. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0716-6>
- Padlan, E. A. (1994). Review Anatomy of the Antibody. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(3), 169–217.

- Paolo, A. Di, Malacarne, P., Guidotti, E., Danesi, R., & Tacca, M. Del. (2010). *Pharmacological Issues of Linezolid An Updated Critical Review*.
- Parray, H. A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., & Ahmed, S. (2020). *Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives*. January.
- Pasko, M. T., Beam, T. R., Spooner, J. A., & Camara, D. S. (1985). Safety and pharmacokinetics of ceftazidime in patients with chronic hepatic dysfunction. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 15). <http://jac.oxfordjournals.org/>
- Pasteur, L. (1877). *Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences*.
- PHARMACIA GmbH. (2007). *Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels / SPC) ZYVOXID®*.
- Pickens, C. I., & Wunderink, R. G. (2019). Principles and Practice of Antibiotic Stewardship in the ICU. In *Chest* (Vol. 156, Issue 1, pp. 163–171). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.01.013>
- Ploy, M. C., Andremont, A., Valtier, B., Le Jeune, C., Del Bano, J., Dumartin, C., Guillemot, D., Bousquet-Melou, A., Brun-Buisson, C., Coignard, B., Concordet, D., Couet, W., Guilhaumou, R., Guyard, C., Jouvin-Marche, E., Kerneis, S., Khelifa, M., Mourez, M., & Verdier, M. C. (2020). Antibiotic resistance: Tools for effective translational research. In *Thérapie* (Vol. 75, Issue 1, pp. 1–6). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.therap.2019.12.001>
- Pos, K. M. (2009). Antibiotika-Resistenz: Die Tricks der Bakterien. *Publikationen.Ub.Uni-Frankfurt.De*, 40–45.
- Rabold, D., Abu Sin, M., Bornemann, R., Clarici, A., Eckmanns, T., Hartmann, J., Hermes, J., Schink, S. B., Tillmann, R., & Perea, I. (2022). Strategies for the rational use of antibiotics in the outpatient sector—results of a workshop with key stakeholders in the healthcare system. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 65(6), 725–728. <https://doi.org/10.1007/s00103-022-03540-z>
- Raem, A., & Rauch, P. (2007). *Immunoassays* (1. Auflage). Elsevier Spektrum Akad. Verl., München.
- Richter, D. C., Heining, A., Brenner, T., Hochreiter, M., Bernhard, M., Briegel, J., Dubler, S., Grabein, B., Hecker, A., Krüger, W. A., Mayer, K., Pletz, M. W., Störzinger, D., Pinder, N., Hoppe-Tichy, T., Weiterer, S., Zimmermann, S., Brinkmann, A., Weigand, M. A., & Lichtenstern, C. (2017). Bacterial sepsis: Diagnostics and calculated antibiotic therapy. *Anaesthesist*, 66(10), 737–761. <https://doi.org/10.1007/s00101-017-0363-8>
- Roberts, J. A., Abdul-Aziz, M. H., Davis, J. S., Dulhunty, J. M., Cotta, M. O., Myburgh, J., Bellomo, R., & Lipman, J. (2016). Continuous versus intermittent  $\beta$ -lactam infusion in severe sepsis: A meta-analysis of individual patient data from randomized trials. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 194(6), 681–691. <https://doi.org/10.1164/rccm.201601-0024OC>

- Rodbard, D. (1974). Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays. *Clinical Chemistry*, 20(10), 1255–1270. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.10.1255>
- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. In *Poultry Science* (Vol. 98, Issue 4, pp. 1791–1804). Oxford University Press. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
- Rudd, K. E., Kissoon, N., Limmathurotsakul, Di., Bory, S., Mutahunga, B., Seymour, C. W., Angus, D. C., & West, T. E. (2018). The global burden of sepsis: Barriers and potential solutions. *Critical Care*, 22(1), 123305059. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2157-z>
- Sadava, D., Hillis, D. M., Heller, H. C., & Hacker, S. D. (2019). Purves Biologie, 10th Edition. In *Purves Biologie*.
- Schulz-Stübner, S. (2020). Antibiotic Stewardship in Arztpraxis und Ambulanz. In *Antibiotic Stewardship in Arztpraxis und Ambulanz*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-60560-8>
- Schweickert, B., Kern, W. V., De With, K., Meyer, E., Berner, R., Kresken, M., Fellhauer, M., Abele-Horn, M., & Eckmanns, T. (2013). Antibiotika-Verbrauchs-Surveillance: Ausführungen und Erläuterungen zur Bekanntmachung "festlegung der Daten zu Art und Umfang des Antibiotika-Verbrauchs in Krankenhäusern nach § 23 Abs. 4 Satz 2 IfSG." *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 56(7), 903–912. <https://doi.org/10.1007/s00103-013-1764-8>
- Shaw, S. Y., Blanchard, J. F., & Bernstein, C. N. (2011). Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *American Journal of Gastroenterology*, 106(12), 2133–2142. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.304>
- Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D., Gansler, T., Lerro, C., Fedewa, S., Lin, C., Leach, C., Cannady, R. S., Cho, H., Scoppa, S., Hachey, M., Kirch, R., Jemal, A., & Ward, E. (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(4), 220–241. <https://doi.org/10.3322/caac.21149>
- Simon, P., Busse, D., Petroff, D., Dorn, C., Ehmann, L., Hochstädt, S., Girrback, F., Dietrich, A., Zeitlinger, M., Kees, F., Kloft, C., & Wrigge, H. (2020). Linezolid Concentrations in Plasma and Subcutaneous Tissue are Reduced in Obese Patients, Resulting in a Higher Risk of Underdosing in Critically Ill Patients: A Controlled Clinical Pharmacokinetic Study. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 1067. <https://doi.org/10.3390/jcm9041067>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubinfeld, G. D., Poll, T. Der, Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 315, Issue 8, pp. 801–810). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Smetsers, T. (2019). *ASSAYFIT PRO USER MANUAL CURVE FITTING AND REGRESSION*.

- Souza, E., Crass, R. L., Felton, J., Hanaya, K., & Pai, M. P. (2020). Accumulation of major linezolid metabolites in patients with renal impairment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.00027-20>
- Spektrum Verlag. (2020). *Lexikon Biologie-Kompakt*. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/antibiose/725>
- Sykes, R. B., & Matthew, M. (1976). *The P-lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to P-lactam antibiotics*. 115–157.
- Tenhagen, B. A., Werner, N., Käsbohrer, A., & Kreienbrock, L. (2018). Transmission pathways for resistant bacteria between animals and humans: antibiotics resistance in the One Health context. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 61(5), 515–521. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2717-z>
- Thomas, L. (2012). *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik* (8. Auflage).
- Tonner, P., & Hein, L. (2019). Pharmakotherapie in der Anästhesie und Intensivmedizin. In *Kemampuan Koneksi Matematis (Tinjauan Terhadap Pendekatan Pembelajaran Savi)* (Vol. 53, Issue 9).
- Vara Prasad, J. (2007). New oxazolidinones. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 10, Issue 5, pp. 454–460). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.08.001>
- Vogel, P. U. B. (2020). *Validierung bioanalytischer Methoden*. Springer Spektrum.
- Voller, A., Bartlett, A., & Bidwell, D. E. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. In *Journal of Clinical Pathology*. <https://doi.org/10.1136/jcp.31.6.507>
- Wendt, S., Ranft, D., de With, K., Kern, W. V., Salzberger, B., & Lübbert, C. (2020). Antibiotic stewardship (ABS). Part 1: Basics. *Internist*, 61(4), 375–387. <https://doi.org/10.1007/s00108-020-00762-8>
- Winkelheide, M. (2021, February 12). *Erste Penicillin-Behandlung vor 80 Jahren Der lange Weg zum Antibiotikum*.
- Wunderink, R. G., Niederman, M. S., Kollef, M. H., Shorr, A. F., Kunkel, M. J., Baruch, A., McGee, W. T., Reisman, A., & Chastre, J. (2012). Linezolid in methicillin-resistant staphylococcus aureus nosocomial pneumonia: A randomized, controlled study. *Clinical Infectious Diseases*, 54(5), 621–629. <https://doi.org/10.1093/cid/cir895>
- Zander, J., Maier, B., Zoller, M., Döbbeler, G., Frey, L., Teupser, D., & Vogeser, M. (2016). Effects of biobanking conditions on six antibiotic substances in human serum assessed by a novel evaluation protocol. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(2), 265–274. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0325>
- Zaroff, S., & Tan, G. (2019). Reports Expert Opinion monoclonal antibody generation for in vivo applications. *BioTechniques*, 67(3), 90–92.
- Zhang, C. (2012). Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol.*, 901:117-35. [https://doi.org/doi:10.1007/978-1-61779-931-0\\_7](https://doi.org/doi:10.1007/978-1-61779-931-0_7).

- Zhang, H., Zhou, Y., Huang, Y., Wu, L., Liu, X., & Luo, Y. (2016). Residues and risks of veterinary antibiotics in protected vegetable soils following application of different manures. *Chemosphere*, *152*, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.111>
- Zoller, M., Maier, B., Hornuss, C., Neugebauer, C., Döbbeler, G., Nagel, D., Holdt, L. M., Bruegel, M., Weig, T., Grabein, B., Frey, L., Teupser, D., Vogeser, M., & Zander, J. (2014). Variability of linezolid concentrations after standard dosing in critically ill patients: A prospective observational study. *Critical Care*, *18*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1186/cc13984>