

# **Entwicklung und Validierung von hochsensitiven Immunoassays zur Analyse von fünf inflammatorischen Biomarkern**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Viviana Angélica Carcamo Yañez  
aus Nürtingen

Tübingen  
2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

22.09.2020

Stellvertretender Dekan:

Prof. Dr. József Fortágh

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

**Betreuer an der Eberhard Karls Universität Tübingen**

Prof. Dr. Stefan Stevanović

und

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

Betreuer am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut  
an der Universität Tübingen

Dr. Jens Göpfert

und

Dr. Thomas Joos

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am NMI – Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen in Reutlingen in der Abteilung Biochemie angefertigt.

Zunächst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Stefan Stevanović** für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Herrn **Prof. Dr. Ulrich Rothbauer** möchte ich für die Zusage danken, meine Dissertation als Zweitgutachter zu betreuen.

Ich danke herzlich **Dr. Thomas Joos** und **Dr. Jens Göpfert**, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit am NMI durchzuführen und mich in allen Arbeitsschritten sehr unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. med. Andreas Nieß**, Leiter und medizinischer Direktor der Abteilung für Sportmedizin am Universitätsklinikum Tübingen und **Prof. Dr. Markus Otto**, Stellvertretende Vorsitzende der Abteilung für Neurologie am Universitätsklinikum Ulm, für die Bereitstellung von wertvollem Probenmaterial. Weiterhin möchte ich mich recht herzlich bei **Prof. Dr. Andreas Peter**, ärztlicher Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Tübingen, für die Möglichkeit Vergleichsmessungen im Zentrallabor durchführen zu lassen, bedanken.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine Kollegen am NMI für ihre Unterstützung, Hilfe und für das gute Arbeitsklima. Besonders danken möchte ich meiner Freundin und Kollegin **Anna Günther** für die tatkräftige Hilfe im Arbeitsalltag und weit darüber hinaus. Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei all meinen **Freunden und Geschwistern** bedanken, die stets für Motivation oder auch Ablenkung gesorgt haben.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei **meinen Eltern** bedanken, die mir stets zur Seite standen und deren Mut neue unbekannte Wege zu gehen alles erst ermöglicht hat.

**Vielen Dank! | ¡Muchas Gracias!**



## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Formelverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis .....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Immunoassays.....	1
1.2 Hochempfindliche Immunoassays.....	2
1.2.1 Simoa-Technologie - Digitale und analoge Signalauswertung .....	4
1.2.2 Simoa-Analysegerät .....	6
1.2.3 Vergleich hochsensitiver Immunoassay-Technologien .....	9
1.3 Immunoassay Validierung .....	11
1.3.1 Grundlagen .....	11
1.3.2 Kalibrierkurvenmodell.....	13
1.3.3 Bestimmungsgrenzen und dynamischer Bereich .....	13
1.3.4 Nachweisgrenze.....	14
1.3.5 Präzision und Richtigkeit.....	14
1.3.6 Wiederfindungsrate .....	15
1.3.7 Verdünnungslinierität .....	15
1.3.8 Parallelität .....	16
1.3.9 Analytstabilität .....	16
1.4 Zytokine und Procalcitonin .....	17
1.4.1 Zytokine .....	17
1.4.2 Procalcitonin.....	19
1.5 Rolle von Zytokinen und PCT bei der Diagnose von Meningitis und bei der Optimierung von Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport.....	20
1.5.1 Meningitis .....	20
1.5.2 Optimierung von Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport ....	21
2 Zielsetzung .....	23
3 Material und Methoden .....	25
3.1 Materialien .....	25
3.1.1 Antikörper.....	25

---

3.1.2 Rekombinante Proteine und WHO-Referenzmaterial .....	25
3.1.3 Humanes und tierisches Plasma .....	26
3.1.4 Reagenzien und Chemikalien.....	26
3.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	27
3.1.6 Puffer und Lösungen .....	27
3.1.7 Geräte und Software .....	27
3.2 Methoden.....	29
3.2.1 Simoa-Immunoassay – Herstellung der Assayreagenzien.....	29
3.2.2 Simoa-Immunoassay – Durchführung .....	31
3.2.3 Entwicklung von Immunoassays.....	33
3.2.4 Validierung der entwickelten Simoa-Immunoassays.....	35
3.2.5 Probengenerierung und Analyse .....	41
3.2.6 Datenanalyse .....	43
4 Ergebnisse.....	51
4.1 Entwicklung und Optimierung von Simoa-Immunoassays .....	51
4.1.1 Identifikation geeigneter Antikörperpaare .....	51
4.1.2 Ermittlung eines geeigneten Assayprotokolls .....	53
4.1.3 Optimierung der Pufferzusammensetzung.....	55
4.1.4 Optimierung der Konzentrationen der Reagenzien .....	59
4.2 Validierung der Simoa-Immunoassays.....	63
4.2.1 Validierungsrichtlinien und Parameter .....	63
4.2.2 Validierung des Kalibrierkurvenmodells .....	64
4.2.3 Bestimmung der Bestimmungsgrenzen .....	67
4.2.4 Bestimmung der Nachweisgrenze .....	68
4.2.5 Bestimmung der Präzision.....	69
4.2.6 Bestimmung der Wiederfindungsrate.....	70
4.2.7 Bestimmung der Verdünnungslinearität.....	71
4.2.8 Bestimmung der Parallelität.....	72
4.2.9 Bestimmung der Analytstabilität .....	73
4.2.10 Korrelation des entwickelten PCT Simoa-Assays mit einem klinischen Analysegerät.....	75
4.3 Quantifizierung der Konzentration von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-17 und PCT in Blutproben gesunder Spender .....	77
4.4 Bestimmung von PCT in Patientenproben mit diagnostizierter Meningitis .....	79
4.5 Quantifizierung der Analytkonzentration IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-17 und PCT in Blutproben ausdauertrainierter Probanden .....	81

---

5 Diskussion .....	85
5.1 Hochsensitive Immunoassay-Plattformen .....	85
5.2 Entwicklung und Optimierung der Simoa-Immunoassays.....	86
5.2.1 Identifikation geeigneter Antikörperpaare .....	86
5.2.2 Assayoptimierung.....	87
5.3 Validierung der Simoa-Immunoassays.....	89
5.3.1 Kalibrierkurvenmodell.....	90
5.3.2 Bestimmungs- und Nachweisgrenzen .....	91
5.3.3 Präzision und Wiederfindungsrate.....	93
5.3.4 Verdünnungslinearität und Parallelität .....	94
5.3.5 Analytstabilität.....	94
5.3.6 Korrelation des entwickelten PCT Simoa-Assays mit Messungen eines klinischen Analyzers .....	95
5.4 Quantifizierung der Konzentration von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-17 und PCT in Blutproben gesunder Spender .....	96
5.5 Bestimmung von PCT in Patientenproben mit diagnostizierter Meningitis .....	98
5.6 Quantifizierung der Analytkonzentration IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-17 und PCT in Blutproben ausdauertrainierter Probanden .....	99
6 Zusammenfassung und Ausblick .....	101
7 Literaturverzeichnis.....	103
8 Lebenslauf.....	111
9 Liste der Publikationen.....	113

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2: Durchführungsprinzip eines Simoa-Assays .....	3
Abbildung 2: Simoa-Auslesedisk mit Arrays, Kavitäten und Strömungskanälen .....	3
Abbildung 3: Simoa-Analysegerät .....	8
Abbildung 4: IPCR Detektionsmodifikationen .....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Preprocalcitonin und Calcitonin. ....	19
Abbildung 6: Darstellung eines Box-Whisker-Plots mit zugehöriger Interpretation der Kennlinien .....	48
Abbildung 7: Initiale Austestung verschiedener Antikörperkombinationen für die Entwicklung der Simoa-Immunoassays. ....	52
Abbildung 8: Vergleich von 2-Schritt und 3-Schrittassayformaten für die Entwicklung der Simoa-Immunoassays. ....	54
Abbildung 9: Ergebnisse der Pufferoptimierung des IFN- $\gamma$ Simoa-Assays. ....	55
Abbildung 10: Ergebnisse der Pufferoptimierung des IL-2 Simoa-Assays. ....	56
Abbildung 11: Ergebnisse der Pufferoptimierung des IL-17 Simoa-Assays. ....	57
Abbildung 12: Ergebnisse der Pufferoptimierung des IL-10 Simoa-Assays. ....	58
Abbildung 13: Ergebnisse der Pufferoptimierung des PCT Simoa-Assays. ....	59
Abbildung 14: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des IL-10 Simoa-Assays. ....	60
Abbildung 15: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des IL-2 Simoa-Assays. ....	61
Abbildung 16: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des IL-17 Simoa-Assays. ....	61
Abbildung 17: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des PCT Simoa-Assays. ....	62
Abbildung 18: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des IFN- $\gamma$ Simoa-Assays. ....	63
Abbildung 19: Graphische Darstellung der Kalibriergeraden der entwickelten Simoa-Immunoassays. ....	65
Abbildung 20: Korrelationsdiagramm der Passing-Bablok Regressionsanalyse PCT Referenzmethode mit dem PCT Simoa-Assay. ....	76

---

Abbildung 21: Streudiagramme der Ergebnisse der Quantifizierung von IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17 und PCT in Proben gesunder Spender zur Bestimmung der jeweiligen Referenzwerte. ....	78
Abbildung 22: Box-Whisker-Plots mit Datenüberschneidung für die Ergebnisse der Quantifizierung von PCT in Patientenproben mit diagnostizierter bakterieller und viraler Meningitis und in einer Kontrollgruppe. ....	80
Abbildung 23: Box-Plot-Diagramme der Laktatkonzentrationen der Probanden an fünf Zeitpunkten vor und nach der Belastung zur Leistungsüberprüfung. ....	82
Abbildung 24: Box-Whisker-Plots für die Ergebnisse der Quantifizierung von IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17 und PCT vor und nach sportlicher Belastung bei 105 % IAS. ....	83

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich von drei hochsensitiven Immunoassays-Testmethoden.....	10
Tabelle 2: Unterschiede zwischen chromatographischen Testmethoden und Immunoassays. .....	12
Tabelle 3: Antikörper.....	25
Tabelle 4: Antikörper mit Biotin-Konjugat. ....	25
Tabelle 5: Rekombinante Proteine.....	25
Tabelle 6: WHO-Referenzmaterial. ....	26
Tabelle 7: Humanes Plasma. ....	26
Tabelle 8: Tierisches Plasma.....	26
Tabelle 9: Reagenzien und Chemikalien.....	26
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 11: Puffer und Lösungen. ....	27
Tabelle 12: Geräte.....	27
Tabelle 13: Software.....	28
Tabelle 14: Plattenbelegung für die Immobilisierung mit dem KingFisher System.....	30
Tabelle 15: Finale Antikörperpaare der entwickelten Simoa-Immunoassays.....	32
Tabelle 16: Überblick der Simoa-Immunoassays. ....	32
Tabelle 17: Standardkonzentrationen der Kalibriergeraden.....	33
Tabelle 18: Zusammensetzung der Standard- und Probenpuffer. ....	33
Tabelle 19: Herstellung der Qualitätskontrollproben.....	36
Tabelle 20: Eingesetzte QC-Proben für die Bestimmung der Intraassay- und Interassay- Präzision.....	38
Tabelle 21: Herstellung der Proben zur Bestimmung der Wiederfindungsrate.....	39
Tabelle 22: Herstellung der Proben zur Bestimmung der Verdünnungslinearität.....	40
Tabelle 23: Verdünnungsfaktoren zur Bestimmung der Parallelität.....	40
Tabelle 24: Spenderdaten zur Bestimmung der Analytlevel in gesunden Spendern.....	41
Tabelle 25: Patientendaten mit diagnostizierter und nicht diagnostizierter Meningitis.....	42
Tabelle 26: Probandendaten zur Bestimmung der Analytlevel in Blutproben ausdauertrainierter	

---

Probanden.....	43
Tabelle 27: Ergebnisse der Ermittlung der Kalibrierkurvenperformance.....	64
Tabelle 28: Ergebnisse der Kalibrierung der Kalibrierkurven mit WHO-Referenzmaterial. ...	66
Tabelle 29: Ergebnisse der Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze.....	67
Tabelle 30: Ermittelten Bestimmungsgrenzen der entwickelten Simoa-Immunoassays.....	68
Tabelle 31: Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenzen. ....	68
Tabelle 32: Ergebnisse der Intraassay-Präzisionsbestimmung. ....	69
Tabelle 33: Ergebnisse der Interassay-Präzisionsbestimmung. ....	70
Tabelle 34: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindungsrate.....	70
Tabelle 35: Ergebnisse der Bestimmung der Verdünnungslinearität.....	72
Tabelle 36: Ergebnisse der Parallelitätsbestimmung.....	73
Tabelle 37: Untersuchung der Analytstabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen.....	74
Tabelle 38: Untersuchung der Kurzzeitstabilität.....	75
Tabelle 39: Vergleich der Bestimmungsgrenzen der Simoa-Immunoassays mit denen kommerziell erhältlicher ELISAs.....	91

---

## Formelverzeichnis

Formel (1) Poisson-Verteilung .....	5
Formel (2) Digitale AEB-Bestimmung .....	5
Formel (3) Analoge AEB-Bestimmung .....	6
Formel (4) $I_{\text{single}}$ -Bestimmung .....	6
Formel (5) Berechnung der Wiederfindungsrate .....	39
Formel (6) 4-parametrisch logistischer Fit .....	44
Formel (7) Berechnung der Testgröße $W$ .....	44
Formel (8) Bestimmung des Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman .....	45
Formel (9) U-Test: Berechnung der Prüfgröße $U$ – Stichprobe 1 .....	46
Formel (10) U-Test: Berechnung der Prüfgröße $U$ – Stichprobe 2 .....	46
Formel (11) U-Test: Berechnung der Prüfgröße $U$ .....	46
Formel (12) Wilcoxon-Test: Berechnung der Prüfgröße $W$ .....	47
Formel (13) Wilcoxon-Test: Berechnung des $z$ -Wertes .....	47
Formel (14) Wilcoxon-Test: Berechnung des Erwartungswertes des $W$ -Wertes .....	47

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti
AEB	Anzahl an Enzymmolekülen pro Mikrosphäre (Average Enzym per Bead)
BM	Bakterielle Meningitis
BSA	Bovines Serum Albumin
CAL	Kalibrator
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement ( <i>Charge Coupled Device</i> )
CD	Unterscheidungsgruppen ( <i>Cluster of Differentiation</i> )
cm	Zentimeter
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit ( <i>Cerebrospinal fluid</i> )
DA	Detektionsantikörper
DNS	Desoxyribonukleinsäure
$\epsilon$	Epsilon, Formelzeichen: molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient
et al.	et alii
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur ( <i>European Medicines Agency</i> )
engl.	englisch
FA	Fängerantikörper
Fc	fragment, crystallizable
FDA	Food and Drug Administration
fg	Femtogramm
$f_{on}$	Anteil an aktiven Mikrosphären ( <i>fraction on</i> )
h	Stunde
hu	human
IAS	Individuelle anaeroben Schwelle
$I_{bead}$	Mittlerer Fluoreszenzintensitätswert der aktiven Mikrosphären im Array ( <i>mean fluorescence intensity of active beads in an array</i> )
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin-G
IL	Interleukin
IPCR	Immuno-Polymerase-Kettenreaktion
IQA	Interquartilsabstand
$I_{single}$	Mittlere Fluoreszenzintensität pro Mikrosphäre ( <i>fluorescence intensity generated by single enzymes on beads</i> )
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
$\lambda$	Lambda, Formelzeichen: Wellenlänge
L	Liter

---

LLoQ	Untere Bestimmungsgrenze ( <i>lower limit of quantification</i> )
LoD	Untere Nachweisgrenze ( <i>lower limit of detection</i> )
LSI	Detektionsmodul des HD-Analysegerätes ( <i>Load-Seal-Image</i> )
mg	Miligramm
min	Minute
MK	Monoklonal
mL	Mililiter
MP	Mikrosphären
MRD	Minimal erforderliche Verdünnung ( <i>minimal required dilution</i> )
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCT	Procalcitonin
pg	Pikogramm
PK	Polyklonal
pM	Pikomolar
QC	Qualitätskontrolle
Ref.	Referenzprobe
rekomb.	rekombinant
RGP	Resorufin $\beta$ -D-Galaktopyranosid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SBG	Streptavidin- $\beta$ -galaktosidase
Simoa	Einzelmolekül-Array ( <i>Single Molecule Array</i> )
SMC	Einzelmolekül-Zählung ( <i>Single Molecule Counting</i> )
sNHS	Sulfo-N-hydroxysuccinimid
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
ULoQ	Obere Bestimmungsgrenze ( <i>upper limit of quantification</i> )
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
VK	Variationskoeffizient
VM	Virale Meningitis
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunoassays

Immunoassays sind analytische Tests, die sich die einzigartigen Bindungseigenschaften von Antikörpern zunutze machen. Dabei ist das Grundprinzip eines Immunoassays die Erkennung eines Zielmoleküls in einer komplexen Probe durch die Bindung von Antikörpern an sein Antigen. Immunoassays ermöglichen die Qualifizierung und die indirekte Quantifizierung (mittels Kalibrierkurven) von Analyten. Dies wird durch drei wichtige Eigenschaften von Antikörpern erreicht: (1) Ihre Fähigkeit, an eine Vielzahl von natürlichen und künstlichen Chemikalien, Biomolekülen, Zellen oder Viren zu binden; (2) Ihre teilweise außerordentlich hohe Bindungsspezifität für die Moleküle, an die der jeweilige Antikörper bindet; (3) die Stärke der Bindung zwischen einem Antikörper und seinem Bindungsziel [1, 2].

Der sensitive Nachweis von Zielproteinen unter Verwendung von Immunoassays ist in vielen wissenschaftlichen und klinischen Bereichen wichtig, darunter z. B. in der Onkologie und der Neurologie [3-5].

Die Sensitivität herkömmlicher Immunoassays für den Nachweis von spezifischen Proteinen in komplexen Proben ist jedoch auch heute noch immer deutlich geringer als die erreichte Sensitivität für den Nachweis von Nukleinsäuren (z. T. 1,2 Millionen Mal weniger empfindlich) [3]. Im Laufe der Jahre hat sich u. a. die Empfindlichkeit der Immunoassays durch alternative Detektionssysteme wie Chemilumineszenz und verschiedene Fluoreszenzausleseverfahren verbessert [6-8].

Erstmals wurde der Einsatz spezifischer Antikörper zur Etablierung verlässlicher diagnostischer Methoden im Jahre 1960 beschrieben [9]. Hier gelang es den heute bekannten Latex-Agglutinationstest zu entwickeln, welcher neben dem ELISA (engl.: Enzyme-linked immunosorbent assay) auch heutzutage noch ein stark verbreiteter diagnostischer Test ist. Im selben Jahr erreichte Rosalyn Yalow einen Meilenstein mit der erstmaligen Beschreibung eines Immunoassays. Sie beschrieb ein Verfahren zur Quantifizierung von Insulin unter Verwendung von Antiseren und radioaktiv markiertem Insulin und schaffte es so erstmals die Antikörper-Antigen-Interaktion durch eine Markierung quantifizierbar zu machen [10]. 1977 wurde sie dafür mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.

Durch die Fortschritte in der Generierung und der Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper gewannen diese auch zunehmend an Bedeutung für Immunoassays und kommen heute sehr häufig in Immunoassays zum Einsatz. Der Einsatz monoklonaler Antikörper ging mit einer verbesserten Empfindlichkeit der Immunoassays und vor allem auch einer deutlich gesteigerten längerfristigen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einher [11]. Eine weitere starke Verbesserung der Durchführbarkeit der Immunoassays und deren Durchsatzfähigkeit wurde durch die Entwicklung von Festphasen-Immunoassays erzielt [12]. Die Einführung von

Mikrosphären-basierten Methoden, bei denen die feste Phase einer Mikrotiterplatte durch z. B. Polystyrolkugeln im Mikrometer-Bereich ersetzt wurde, führte zusätzlich zur Möglichkeit paralleler multiplexer Analytik. Diese Fortschritte, gekoppelt mit der Standardisierung der Einzelmolekül-Detektion und der Fähigkeit Assay-Signale zu verstärken, haben die Empfindlichkeit vieler Immunoassays stark verbessert [7]. Inzwischen stehen daher Technologien zur Verfügung, die hochempfindliche Analysen bis in den zweistelligen Femtogramm pro Milliliterbereich erlauben [8, 13].

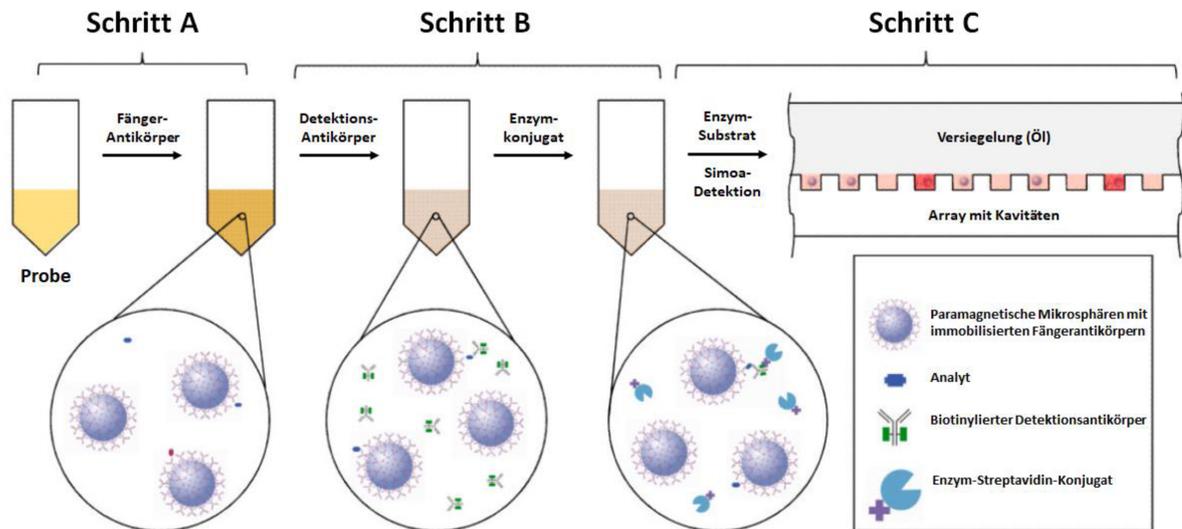
## 1.2 Hochempfindliche Immunoassays

Die Single Molecule Array (Abk.: Simoa)-Technologie, der Firma Quanterix (Quanterix Corp., Lexington, MA, US), ist eine Mikrosphären-basierte hochsensitive Immunoassay Plattform [3, 14-17]. Analog zu einem konventionellen ELISA basiert die Signalgenerierung auf einer enzymatischen Reaktion [18]. Diese neuartige Technologie ermöglicht, im Gegensatz zu ELISAs, die Detektion von einzelnen enzymmarkierten Immunkomplexen u. a. durch einen stark reduzierten Reaktionsraum und erreicht so einen hochsensitiven Nachweis von Proteinen.

Für die Durchführung eines Simoa-Immunoassays erfolgt in einem ersten Schritt die Bildung des Immunkomplexes (bestehend aus Fängerantikörper, Analyt und Detektionsantikörper), gefolgt von der Markierung dieser Komplexe mit Enzymmolekülen ( $\beta$ -Glaktosidase) über eine Biotin-Streptavidin-Bindung. Hierbei liegt der Detektionsantikörper biotinyliert vor und das Enzym in Form eines Streptavidin-Enzym-Konjugates. Die Mikrosphären, aufgenommen in Enzymsubstratlösung (Resorufin  $\beta$ -D-Galaktopyranosid), werden anschließend in Arrays mit ca. 50-femtoliter großen Kavitäten, den Reaktionskammern, geladen und diese Kavitäten durch Beschichtung mit Öl versiegelt. Hierbei erfolgt das Vereinzeln der Mikrosphären, da die Größe der Kavitäten nur genügend Raum für genau eine Mikrosphäre bietet (Abbildung 2) [3, 14-17].

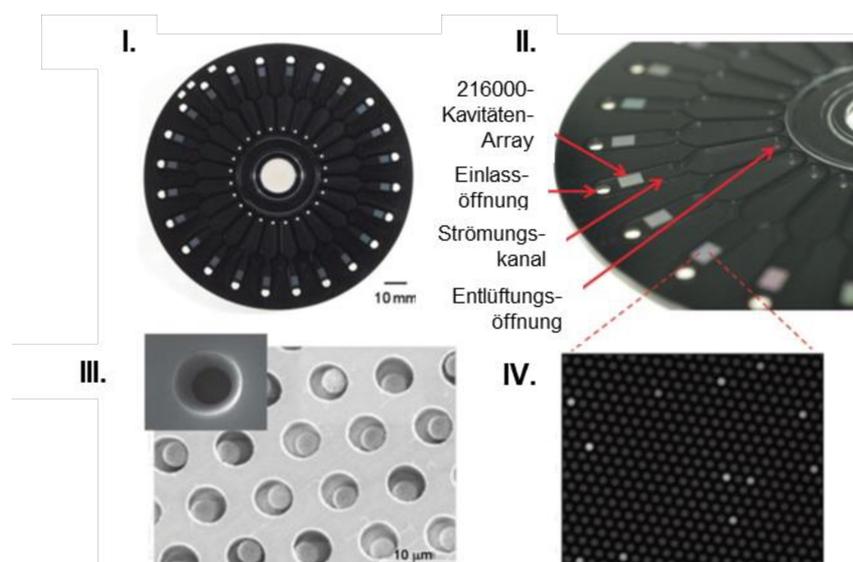
Die Arrays mit den Kavitäten befinden sich auf einer speziell für die Simoa-Technologie entwickelten Auslesedisk (engl.: disc), basierend auf der Blu-ray-Technologie, bestehend aus 24 Arrays mit jeweils 216000 Kavitäten und 24 Strömungskanälen (engl.: fluidic channels) (Abbildung 2). Mikrosphären (engl.: beads), die eine oder mehrere Enzyme bzw. Immunkomplexe tragen, erzeugen in Verbindung mit dem Enzymsubstrat durch Hydrolyse das Fluoreszenzprodukt Resorufin. Das Fluoreszenzsignal wird im Ausleseschritt mittels CCD-Kamera (engl.: Charge Coupled Device; dt.: ladungsgekoppeltes Bauelement) detektiert. Dabei müssen für die Auslese von Simoa-Signalen geringe Mengen an umgesetzten Substratmolekülen detektiert werden können. Dies ist mit den meisten Standardassay-Technologien nicht möglich (z. B. Auslese eines ELISAS mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät), da die erzeugten Fluorophore hierbei in ein großes Testvolumen (typischerweise

> 50  $\mu\text{L}$ ), bedingt durch die großen Reaktionskammern, diffundieren. Für klassische ELISAs bedeutet dies, dass Hunderttausende Enzymmoleküle benötigt werden, um ein detektierbares Fluoreszenzsignal zu erzeugen.



**Abbildung 2: Durchführungsprinzip eines Simoa-Assays**

Schritt A: Binden des Analyten an Fängerantikörper (immobilisiert an paramagnetischen Mikrosphären).  
 Schritt B: Bindung des biotinylierten Detektionsantikörpers an Analyten und anschließend des Enzymkonjugates.  
 Schritt C: Laden der Mikrosphären, aufgenommen in Enzymsubstratlösung, in den Array und Versiegelung mit Öl für die Detektion. Modifizierte Abbildung nach [3].



**Abbildung 2: Simoa-Auslesedisk mit Arrays, Kavitäten und Strömungskanälen**

(I.) Simoa-Auslesedisk mit 24 Arrays: Ansicht von unten. (II.) Nahaufnahme der Simoa-Auslesedisk mit Merkmalen der Arrays: Einlassöffnungen (engl.: fluidic inlet port), 500  $\mu\text{m}$  tiefe Strömungskanäle, Entlüftungsöffnung (engl.: vent por) entspricht der Öffnung über die ein Vakuum zum Befüllen der Arrays angelegt wird. (III.) Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme eines Arrays. (IV.) CCD-Kameraaufnahme der Simoa-Auslesedisk während dem Auslesen mit detektierten Enzymsignalen (leuchtende Punkte). Modifizierte Abbildung nach [14].

Im Gegensatz dazu ermöglicht die Simoa-Technologie den Nachweis sehr geringer Konzentrationen von enzymatisch umgesetzten Substratmolekülen, indem die Diffusion der erzeugten Fluorophore auf die extrem kleinen Reaktionskammern (50-femtoliter Kavitäten) auf der Simoa-Auslesedisk beschränkt wird. Dadurch wird eine hohe lokale Konzentration an Fluorophoren erzeugt, die mittels CCD-Kamera über Bildaufnahmen (Dunkelfeld- und Fluoreszenzaufnahmen) detektiert werden kann. Diese lokale Konzentration der erzeugten Fluorophore, die enzymbedingte Signalamplifikation und das Vereinzeln der Mikrosphären beim Beladen der Arrays, macht es möglich, dass ein einzelnes an einen Antikörper gebundenes Enzym ausreichend Substrat zur Detektion des Signals erzeugen kann und somit eine Einzelmoleküldetektion stattfindet [14-17, 19].

### 1.2.1 Simoa-Technologie - Digitale und analoge Signalauswertung

Die Auswertung der generierten Bildaufnahmen und somit des erzeugten Fluoreszenzsignals pro Array (und dadurch pro Probe) erfolgt über die digitale oder die analoge Signalauswertung durch die Simoa-Software (Hersteller: Quanterix Corp.). Bei der Signalauswertung wird durch das generierte Fluoreszenzsignal der Mittelwert der Anzahl an Enzymmolekülen pro Mikrosphäre (engl.: Average Enzym per Bead; Abk.: AEB) ermittelt.

Die Signalauswertung ist hierbei abhängig von dem Verhältnis zwischen der Anzahl der aktiven (engl.: „on“ Beads) und der nicht aktiven (engl.: „off“ Beads) Mikrosphären. Aktive Mikrosphären sind Mikrosphären, die einen Immunkomplex tragen und bei denen durch die Enzymreaktion ein Fluoreszenzsignal generiert wird. Nicht aktive Mikrosphären tragen keinen Immunkomplex und es wird kein Fluoreszenzsignal generiert. Sind mindestens 70 % der ausgelesenen Mikrosphären aktiv, erfolgt eine analoge Signalauswertung. Sind weniger als 70 % der gesamten Mikrosphären aktiv, erfolgt eine digitale Signalauswertung [16].

Bei der Untersuchung von Proben mit niedriger Analytkonzentration ist das Verhältnis von Analyt und Mikrosphären klein, d. h. die Mikrosphären liegen im großen Überschuss vor. Pro Probe werden hierbei ca. 0,5 Millionen Mikrosphären eingesetzt. Bedingt durch diesen starken Mikrosphärenüberschuss und einer im Vergleich dazu sehr geringen Analytkonzentration, folgt der Prozentsatz der aktiven Mikrosphären einer Poisson-Verteilung. Bei sehr niedrigen Verhältnissen von Analyt und Mikrosphären (weniger als 10 % aktive Mikrosphären), d. h. bei sehr niedriger Analytkonzentration in der Probe, tragen die Mikrosphären, basierend auf der Poisson-Wahrscheinlichkeitsverteilung, entweder nur einen Immunkomplex oder keinen. Dies ermöglicht das Zählen von aktiven Mikrosphären unabhängig von der Intensität des erzeugten Fluoreszenzsignals in den Kavitäten zur Bestimmung der Analytkonzentration, weswegen diese Analyseverfahren als „digital“ bezeichnet wird.

Mit zunehmender Analytkonzentration steigt der prozentuale Anteil der aktiven Mikrosphären (engl.: fraction „on“, Abk.:  $f_{on}$ ) in etwa linear an. Bei einem höheren Anteil an aktiven

Mikrosphären (mehr als 10 % aktive Mikrosphären) steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass es eine signifikante Anzahl von Mikrosphären gibt, die mehr als nur einen Immunkomplex tragen [3, 15, 16]. Mit Hilfe der Poisson-Verteilung kann die Anzahl der aktiven Mikrosphären in die Anzahl der nachgewiesenen Enzyme umgewandelt werden und somit die Analytkonzentration, unter Berücksichtigung der Aufrechterhaltung der Linearität in den Subpopulationen der Mikrosphären mit mehreren Immunkomplexen, bestimmt werden [15, 16, 19].

Die Poisson-Verteilung (Gleichung (1)) beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Reihe von Ereignissen eintreten, wenn die durchschnittliche Anzahl von Ereignissen bekannt ist. Wenn die erwartete durchschnittliche Anzahl von Ereignissen  $\mu$  ist, dann ist die Wahrscheinlichkeit, dass es genau  $v$  Ereignisse gibt ( $v$  ist eine nicht-negative ganze Zahl) gleich:

$$P_{\mu}(v) = e^{-\mu} \left( \frac{\mu^v}{v!} \right) \quad (1)$$

Im Simoa-Assayaufbau ist  $\mu$  gleich dem Verhältnis von gebundenen Proteinen (= Anzahl der gebildeten Immunkomplexe) zur Anzahl der Mikrosphären und  $v$  ist die Anzahl der enzymmarkierten Proteine, die von jeder Subpopulation von Mikrosphären getragen werden (d. h. 0, 1, 2, 3, etc.). Zur Bestimmung des AEB-Wertes muss  $\mu$  bestimmt werden, das als quantitativer Parameter zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet werden kann.

Im digitalen Analysemodus kann nicht unterschieden werden, ob aktive Mikrosphären mehr als nur ein Immunkomplex tragen, d. h. ob  $v \geq 1$  ist. Nicht aktive Mikrosphären ( $v = 0$ ) sind hierbei aber eindeutig von aktiven Mikrosphären unterscheidbar (kein Fluoreszenzsignal). Es gilt, dass der Anteil der nicht aktiven Mikrosphären gleich 1 (100 % aller Mikrosphären) minus dem Anteil der aktiven Mikrosphären ( $f_{on}$ ) ist. Demnach lässt sich Gleichung (1) zur Bestimmung von  $P_{\mu}(0)$  wie folgt vereinfachen:

$$\mu = AEB_{digital} = -\ln(1 - f_{on}) \quad (2)$$

Gleichung (2) macht ersichtlich, dass zur AEB-Bestimmung im digitalen Bereich nur der Anteil der aktiven Mikrosphären benötigt wird ( $f_{on}$ ), was wie bereits beschrieben, das Zählen von aktiven Mikrosphären, unabhängig von dem erzeugten Fluoreszenzsignal, in den Kavitäten ermöglicht [16].

Die Quantifizierung der Analytkonzentration durch Zählen der aktiven Mikrosphären und Anwendung der Poisson-Verteilung (digitale Analyseverfahren) ist möglich, wenn der Anteil der aktiven Mikrosphären unter 70 % liegt. Steigt der Anteil der aktiven Mikrosphären auf über 70 %, nimmt die Anzahl der Mikrosphären mit mehreren gebundenen Immunkomplexen stark zu. Der für die digitale Analyseverfahren benötigte lineare Zusammenhang zwischen den AEB-Werten und der Konzentration ist dadurch nicht mehr gegeben. Demnach würde die Verwendung von Gleichung (2) bei > 70 % aktiver Mikrosphären zu einer ungenauen Konzentrationsbestimmung führen. Zusätzlich dazu ist die Anwendung des Zählansatzes

spätestens dann nicht mehr möglich, wenn 100 % der Mikrosphären mindestens ein Enzymmolekül tragen. Um aber auch Proben mit hoher Analytkonzentration analysieren zu können, wurde der dynamische Bereich der Signalauswertung um eine analoge Analyseverfahren erweitert. Für die analoge Signalauswertung ist es notwendig die Anzahl der durchschnittlich an eine Mikrosphäre gebundenen Enzymmoleküle zu bestimmen [15, 16]. Hierfür wird der analoge AEB-Wert (Gleichung (3)) aus dem mittleren Fluoreszenzintensitätswert der aktiven Mikrosphären im Array (engl.: mean fluorescence intensity of active beads in an array; Abk.:  $I_{bead}$ ), der mittleren Fluoreszenzintensität (engl.: mean fluorescence intensity generated by single enzymes on beads; Abk.:  $I_{single}$ ) und dem Anteil der aktiven Mikrosphären ( $f_{on}$ ), berechnet.

$$AEB_{analog} = \frac{f_{on} \cdot \bar{I}_{bead}}{\bar{I}_{single}} \quad (3)$$

Die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität, die von einem einzelnen Enzym an einer Mikrosphäre ( $I_{single}$ ) erzeugt wird, erfolgt hierbei in Proben einer Messreihe mit sehr niedriger Analytkonzentration (weniger als 10 % aktive Mikrosphären). Bei dieser geringen Anzahl an aktiven Mikrosphären tragen, wie oben beschrieben, die meisten aktiven Mikrosphären nur ein Immunkomplex und eine Substratverarmung ist vernachlässigbar. Hierdurch wird in diesem Bereich die Fluoreszenzintensität einer aktiven Mikrosphäre von einem einzelnen Immunkomplex erzeugt, was dem zu bestimmenden  $I_{single}$ -Wert entspricht und das Gleichsetzen von Gleichung (2) und Gleichung (3) ermöglicht. Daraus resultiert folgende Gleichung zur Bestimmung des  $I_{single}$ -Wertes:

$$\bar{I}_{single} = \frac{f_{on} \cdot \bar{I}_{bead}}{-\ln(1 - f_{on})}, \text{ für } f_{on} < 0,1 \quad (4)$$

Um die digitale und analoge Signalauswertung zu kombinieren, ist demnach in jedem Analyselauf die Analyse von Proben mit sehr geringer Analytkonzentration notwendig, um den  $I_{single}$ -Wert für den gesamten Analyselauf zu bestimmen. Diese Anforderung wird i. d. R. bereits durch Standardpunkte der Kalibratorreihe, die diesen Konzentrationsbereich abdecken, erfüllt [16].

### 1.2.2 Simoa-Analysegerät

Die Simoa HD-1 bzw. HD-X (zweite Generation) Analysegeräte der Firma Quanterix sind vollautomatische Messgeräte (engl.: Analyzer) zur Durchführung von Simoa-Immunoassays. Diese bestehen aus fünf Hauptfunktionsbereichen (Abbildung 3): (1) Bereich zur Aufnahme von Einweg-Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen, Reaktionsküvetten, Simoa-Auslesedisks), Reagenzien und Proben; (2) Bereich für Systemflüssigkeiten und Abfälle; (3) Benutzeroberfläche; (4) Chemiemodul-Bereich mit Inkubations- und Waschrinnen (inkl.

Pipettierarmen); (5) Detektionsmodul (engl.: Load-Seal-Image; Abk.: LSI).

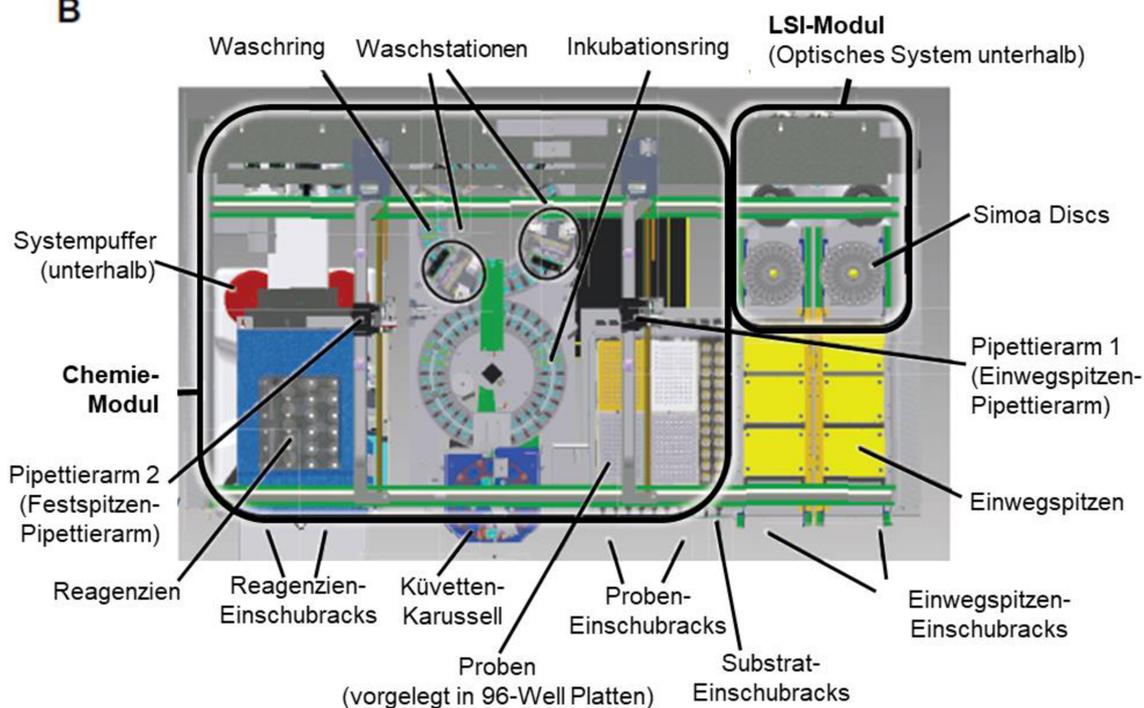
Das Chemiemodul ist ein System zur sequenziellen Handhabung der Reaktionsküvetten. Die Durchführung eines Simoa-Immunoassays erfolgt in diesen gerätespezifischen Reaktionsküvetten, hierbei wird für jede zu analysierende Probe eine Küvette verwendet. Grundlegende chemische Vorgänge für jede Probe (z. B. Pipettieren, Küvettenbewegung, Waschen) erfolgen mit einer Verarbeitungsfrequenz (engl.: cadence) von 45 s. Die Verarbeitungsfrequenz ist hierbei die Zeiteinheit, in der wiederholte Geräteoperationen für die sequenzielle Probenverarbeitung durchgeführt werden. Hierdurch wird jede Küvette identischen Zeitbedingungen ausgesetzt.

Die Küvetten werden im Chemiemodul zwischen dem Inkubationsring und dem Waschring transportiert. Im Inkubationsring erfolgen die Zugabe der Reagenzien/Probe, das Mischen der Lösungen (integrierter Schüttelmechanismus) und die Inkubation nach erfolgter Zugabe der Reagenzien. Im Waschring erfolgen alle Waschschriffe mit eingebauten Magneten zur Retention der Mikrosphären während den Waschschriffen. Die Durchführung von Pipettierschriffen erfolgt mit zwei x-y-z-Pipettierarmen. Ein Pipettierarm mit Einwegspitzen für die probenspezifischen Schriffe und ein Pipettierarm mit einer Metallspitze für die Reagenzienzugabe. Die probenspezifischen Schriffe sind hierbei der Probenübertrag von der Probenplatte in die Reaktionsküvetten und der Übertrag der Mikrosphären-Substrat-Lösung in die Simoa-Auslesedisk. In diesen Schriffen wird durch Einwegspitzen eine Kreuzkontamination der Proben vermieden. Der Festspitzen-Pipettierarm kommt nicht in direkten Kontakt mit den zu analysierenden Proben. Nach dem Pipettieren der Reagenzien in die Reaktionsküvette wird die Metallspitze in einem integrierten Ultraschallwasserbad gereinigt. Das Beladen der Simoa-Auslesedisk mit der Mikrosphären-Substrat-Lösung erfolgt im LSI-Modul. Die Simoa-Auslesedisks werden hierbei durch einen Transportmechanismus auf das LSI-Modul gelegt. Durch Anlegen eines Vakuums wird die Mikrosphären-Substrat-Lösung („Load“) und in einem zweiten Schriff das Öl zum Verschließen der Kavitäten („Seal“) über den Array gezogen. Anschließend folgen die Bildaufnahme und die Bildauswertung („Image“) durch die CCD-Kamera im LSI-Modul.

**A**



**B**



**Abbildung 3: Simoa-Analysegerät**

(A) Standgerät Außenansicht mit drei der Hauptbereiche. (B) Draufsicht auf die wichtigsten internen Komponenten der Chemie- und LSI-Module. Modifizierte Abbildung nach [14].

Zur Signalauswertung werden vier Bildaufnahmen benötigt: (1) Dunkelfeldaufnahme: Festlegung der Arraygrenzen und Detektion der mit Mikrosphären beladenen Kavitäten; (2) Fluoreszenzaufnahme 1: Detektion des Resorufin-Fluoreszenzsignals bei 622/615 nm (Extinktions-/Emissionswellenlänge); (3) Fluoreszenzaufnahme 2: Zweite Fluoreszenzaufnahme zur Detektion einer Zunahme des Resorufin-Fluoreszenzsignals 30 s nach der ersten Aufnahme; (4) Fluoreszenzaufnahme 3: Fluoreszenzaufnahme bei 490/530 nm (Extinktions-/ Emissionswellenlänge) zur Detektion von Störfluoreszenzsignalen bedingt durch die Autofluoreszenz von Polymeren der Simoa-Auslesedisk. Das Resorufin-Fluoreszenzsignal in einer Kavität wird nur als positives Signal gewertet und damit analysiert, wenn es zwischen der Fluoreszenzaufnahme 1 und 2 zu einer Signalerhöhung, bedingt durch die enzymatische Signalamplifikation, kommt [14].

### 1.2.3 Vergleich hochsensitiver Immunoassay-Technologien

Weitere hochsensitive Immunoassay-Technologien (Tabelle 1) sind u. a. die SMC-Technologie der Firma Merck (Darmstadt, DE) ursprünglich entwickelt von der Firma Singulex (Alameda, CA, US) unter dem Systemnamen Erenna und die Immuno-PCR (Imperacer)-Technologie der Firma Chimera Biotec GmbH (Dortmund, DE) [7, 20, 21].

Für die Durchführung eines Einzelmolekül-Zählungs-Assays (engl.: Single Molecule Counting, Abk.: SMC) wird in einem ersten Schritt ein Immunoassay im Mikrosphären- oder im Plattenformat durchgeführt. Hierbei liegen der Fängerantikörper biotinyliert und der Detektionsantikörper fluoreszenzmarkiert vor. Die Bindung des Fängerantikörpers an die feste Phase (Mikrosphären oder Platte) erfolgt über Streptavidin, welches zuvor an der festen Phase immobilisiert wurde. Nach Bildung der Immunkomplexe und stringenten Waschschrinen werden die Immunkomplexe mit einem definierten kleinen Volumen Elutionspuffer von den Mikrosphären bzw. der Platte eluiert, wodurch es zu einer Aufkonzentrierung des fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpers und somit des Fluoreszenzsignals kommt. Das Eluat wird anschließend in eine 384-Mikrotiterplatte übertragen (Transferschritt) und in das Messgerät gestellt. Zur Analyse wird das Eluat über eine Kapillare in eine Durchflusszelle geleitet. In diese Zelle wird Laserlicht über einen dichroitischen Spiegel und über eine konfokale Mikroskoplinse geleitet und eine 5 µm große Messzelle generiert. Passieren fluoreszenzmarkierte Detektionsantikörper diese Messzelle, emittieren diese Fluoreszenzlicht, welches mittels Photonendetektor als Impuls detektiert wird. Solch ein Impuls wird dann als positives Signal gezählt und somit digital ausgelesen. Das Endsignal ist die Summe aller detektierter Ereignisse (engl.: detected events, Abk.: DE). Mit zunehmender Analytkonzentration, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei fluoreszenzmarkierte Antikörper die Messzelle passieren. Das generierte Fluoreszenzsignal wird demnach durch mehrere fluoreszenzmarkierte Antikörper erzeugt (DE-Signal nicht mehr verwendbar) und ist

proportional höher, was Rückschlüsse auf die Anzahl der Antikörper zulässt. Das Endsignal ist hier die Summe der gezählten Photonen (engl.: photonen events, Abk.: PE) in allen detektierten Ereignissen. Mit weiter steigender Analytkonzentration erreicht das PE-Signal eine Sättigung.

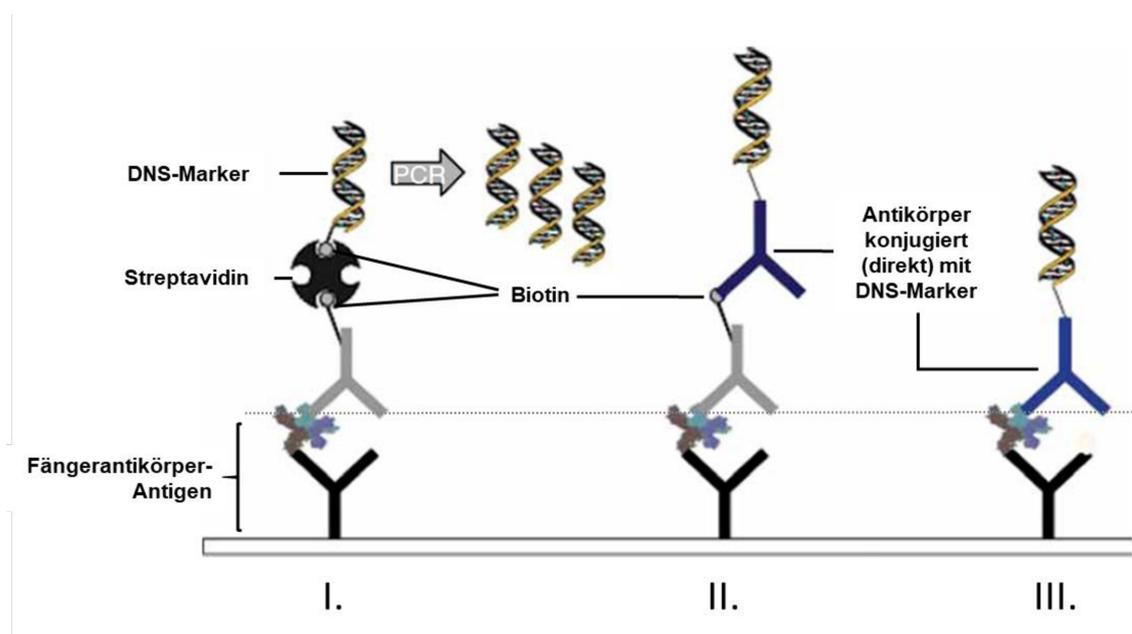
**Tabelle 1: Vergleich von drei hochsensitiven Immunoassays-Testmethoden**  
Modifizierte Tabelle nach [7].

<b>Merkmal</b>	<b>SMC</b>	<b>IPCR</b>	<b>Simoa</b>
Sensitivitätsbereich	fg-pg·mL <sup>-1</sup>	fg-pg·mL <sup>-1</sup>	fg-pg·mL <sup>-1</sup>
Messverfahren	Durchflusszytometrie	Real-time PCR	Enzym/ Substratumsetzung (CCD-Kamera)
Signalauslese	Digital und Analog	Analog	Digital und Analog
Assay - feste Phase	Mikrosphären oder Platte	Platte	Mikrosphären
Ca. Probenvolumen (verdünnte Probe für ein Datenpunkt)	100 µl	30 µl	100 µl
Signalamplifikation	Keine	Exponentiell	Enzymatisch
Typische minimale Verdünnung	Unverdünnt – 1:10	1:2 – 1:10	1:2 – 1:4
Detektionsantikörpermarkierung	Alexa Fluor Farbstoff	DNS-Markierung	Biotin (Streptavidin- β-galaktosidase)
Automatisierung	Keine	Keine	Vollautomatisch
Multiplexing	Nein	2-plex	10-plex
Dynamischer Bereich	> 4 logs	> 4 logs	> 4 logs
Einzelanbieter (Technologiehersteller)	Ja	Ja	Ja
Hersteller-Geschäftsmodell	Kommerzielle Kits, speziell angefertigte Kits, Reagenzien zum Herstellen von Kits durch Anwender		

Als Endsignal wird hier die Summe aller PE-Signale, die Gesamtphotonenzahl (engl.: total photons, Abk.: TP) verwendet. DE-, PE- und TP-Signale werden eingesetzt, um eine Logistikkurvenanpassung für jeden Signaltyp zu generieren und somit einen hohen dynamischen Bereich zu erzeugen. Die hohe Empfindlichkeit wird demnach aufgrund folgender Punkte erreicht: (1) Aufkonzentrierung der fluoreszenzmarkierten Antikörper durch Elution in kleine Volumina; (2) digitale Auslesung einzelner positiver Ereignisse; (3) niedriger Hintergrund durch mehrfache Wasch- und Transferschritte während der Assaydurchführung [7, 21].

Die Methode der Immuno-Polymerase-Kettenreaktion (Abk.: IPCR) kombiniert die hohe Sensitivität der Polymerasen-Kettenreaktion (Abk.: PCR) mit der Spezifität der Antikörperbindung von Immunoassays und wurde bereits im Jahr 1992 beschrieben [7, 20, 22]. Hierbei wird der Fängerantikörper an eine feste Phase immobilisiert und zur Detektion wird ein Antikörper-DNS-Konjugat (Desoxyribonukleinsäure, Abk.: DNS) eingesetzt. Das Antikörper-DNS-Konjugat wird mit Hilfe eines Verbindungsmoleküls (engl.: linker) gebildet. Als

Verbindungsmolekül wird i. d. R. ein Chimär aus Streptavidin, zur Bindung der biotinylierten DNS, und Protein A, zur Bindung des konstanten Bereiches (Abk.: Fc-Fragment) von Immunglobulin-G (Abk.: IgG), eingesetzt. Die nach Bildung eines Immunkomplexes gebundene DNS dient als Marker und kann mittels qPCR amplifiziert, detektiert und quantifiziert werden. Über den Nachweis des entstandenen PCR-Produktes erfolgt der Nachweis der Zielanalyten [22]. Weiterentwicklungen dieses Verfahrens umfassten u. a. Modifikationen der Konjugation des Detektionsantikörpers mit dem DNS-Marker (Abbildung 4) [20].



**Abbildung 4: IP-PCR Detektionsmodifikationen**

(I.) Bildung des Detektionsantikörper-DNS-Konjugates über Streptavidin als Verbindungsmolekül. Detektionsantikörper und DNS-Marker liegen biotinyliert vor. Bildung in zwei Reaktionsschritten; (II.) DNS-Marker direkt konjugiert an anti-Biotin-Antikörper (3. Antikörper). Bindung von anti-Biotin-Antikörper an biotinylierten Detektionsantikörper zur Bildung des Detektionsantikörper-DNS-Konjugates. Bildung in einem Reaktionsschritt möglich; (III.) DNS-Marker direkt konjugiert an antigenspezifischen Detektionsantikörper. Modifizierte Abbildung nach [20].

## 1.3 Immunoassay Validierung

### 1.3.1 Grundlagen

Für die zuverlässige quantitative Bestimmung von Analyten, wie z. B. Medikamente und Biomarker in gegebenen biologischen Matrices wie Serum, Plasma oder Urin ist eine Validierung der Analyseverfahren notwendig. Durch die Validierung von u. a. Immunoassays werden die notwendige Qualität, Zuverlässigkeit, Richtigkeit und Eignung der Analyseverfahren für den bestimmungsgemäßen Gebrauch aufgezeigt. Demnach ist die Validierung eines Immunoassays die Bestätigung durch experimentelle Prüfung und damit objektiver Nachweis dafür, dass die Anforderungen für den bestimmten Verwendungszweck erfüllt werden [23-26].

Für die Durchführung einer Validierung mit zu adressierenden Parametern gibt es Regularien gesetzlicher Behörden, die als Grundlagen dienen können. Die Dokumente „*Guideline on bioanalytical method validation*“ der Europäischen Arzneimittel-Agentur (engl.: European Medicines Agency, Abk.: EMA) und „*Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*“ der US-amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl.: Food and Drug Administration, Abk. FDA) geben Richtlinien für die Validierung von Analysemethoden vor [23, 24]. Ausgearbeitet wurden diese im Jahr 2011 bzw. 2001 veröffentlichten Regularien für die Validierung chromatographischer Methoden und sind nur zum Teil für die Validierung von Liganden-Bindungsassays, wie Immunoassays, ausgerichtet. Einige Unterschiede zwischen chromatographischen Testmethoden und Immunoassays (Tabelle 2) veranschaulichen die Notwendigkeit von zusätzlichen Leitlinien für die Validierung von immunologisch basierten Testmethoden [27].

**Tabelle 2: Unterschiede zwischen chromatographischen Testmethoden und Immunoassays.**  
Modifizierte Tabelle nach [27].

<b>Merkmal</b>	<b>Chromatographische Testmethoden</b>	<b>Immunoassays</b>
Messgrundlage	Physikalisch-chemische Eigenschaften des Analyten	Antigen-Antikörper-Bindung
Analytische Reagenzien	Gut charakterisiert und allgemein verfügbar.	Stark assayspezifisch und nicht unbedingt allgemein verfügbar.
Analyten	Kleine Moleküle	Kleine Moleküle und Makromoleküle
Nachweismethode	Direkt	Indirekt
Probenvorbehandlung notwendig	Ja	i. d. R. Nein
Kalibrierkurvenmodell	Linear	Nicht-Linear
Assay-Umgebung	Enthält organische Lösungsmittel	Wässriges Milieu
Zeitaufwand für Assayentwicklung	Wochen	Monate (z. T. bedingt durch Antikörpergenerierung)
Mittlere Ungenauigkeit (interassay)	Niedrig (< 10 %)	Mäßig (< 20 %)
Quelle der Ungenauigkeit	Intraassay	Interassay
Dynamischer Bereich	Breit	Limitiert
Ausrüstungskosten	Hoch	Niedrig
Durchsatz	Gut	Sehr gut

Trotz der abweichenden Analysemethode können die in den Richtlinien beschriebenen Validierungsparameter und Bestimmungsmethoden dieser Parameter ebenfalls für die Validierung von Immunoassays in einem zweckgerichteten Ansatz (engl.: fit-for-purpose approach) verwendet werden [27, 28]. Im Jahr 2018 veröffentlichte die FDA eine neue Revision des Dokumentes für die Validierung bioanalytischer Methoden, welches explizit und ausführlich hinsichtlich Liganden-Bindungsassays erweitert wurde und somit auch für diese Methoden Richtlinien beinhaltet [26].

Für die Durchführung einer Basisvalidierung ist die Ermittlung folgender Parameter notwendig: Kalibrierkurvenmodell, Bestimmungsgrenzen (obere- und untere Bestimmungsgrenze), Nachweisgrenze, Präzision (Intraassay- und Interassay-Präzision), Wiederfindungsrate, Verdünnungslinearität, Parallelität und Analytstabilität (Kurzzeitstabilität und die Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen).

### 1.3.2 Kalibrierkurvenmodell

Der Zusammenhang zwischen dem Messsignal eines Immunoassays und der eingesetzten Analytkonzentration wird durch ein Kalibrierkurvenmodell bzw. eine Kalibrierfunktion indirekt beschrieben [29]. Durch ein geeignetes Kalibrierkurvenmodell wird eine robuste Quantifizierung der Analytkonzentration aus erhaltenem Messsignal der vermessenen Probe und Kalibrierkurvensignal durchgeführt. Dabei ist bei Immunoassays ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen Signal und Analytkonzentration häufig. Besser wird der Zusammenhang durch eine Sigmoidfunktion vierten oder auch fünften Grades beschrieben. Erfüllen mehrere Modelle die notwendigen Akzeptanzkriterien sollte immer das einfachste Modell gewählt werden [23-27]. Für die Generierung einer Kalibrierkurve wird das Zielprotein (Standardmaterial) in bekannten Konzentrationen in eine geeignete Matrix gegeben und unter etablierten Testbedingungen eine Konzentrationsreaktionsbeziehung erzeugt [30]. Das ggf. rekombinante Standardmaterial sollte hierbei idealerweise dem endogenen Zielprotein entsprechen, zumindest jedoch stark ähneln. Eine Kalibrierkurve sollte aus mindestens sechs Kalibratorkonzentrationen bestehen und diese sollten hierbei gleichmäßig über den Assaybereich verteilt werden [23]. Ein weiterer Punkt bei der Etablierung von Kalibrierkurvenmodellen für Liganden-Bindungsassays ist, dass die Standardabweichung der generierten Messsignale in der Regel nicht über den gesamten Kalibrierkurvenbereich konstant ist. Bei den meisten Immunoassays steigt die Variabilität des Assaysignals zwischen den Replikaten jedes Kalibrators proportional zum Mittelwert des Signals an. Um daraus resultierende Fehler und minderwertige Ergebnisse zu vermeiden, ist eine Kurvenanpassung mit entsprechender Gewichtung für ungleiche Standardabweichungen vorteilhaft. Durch geeignete Kurvenanpassungsmethoden (z. B.  $1/X$ ,  $1/X^2$ ,  $1/Y$  oder  $1/Y^2$ ) werden die Daten proportional zur Höhe der Variabilität gewichtet und damit die Qualität der Kalibriergeraden gesteigert. Die Beurteilung eines Kalibrierkurvenmodelles kann anhand der Wiederfindungsrate, dem relativen Fehler und der Präzision der Kalibriergeraden erfolgen [28].

### 1.3.3 Bestimmungsgrenzen und dynamischer Bereich

Die untere Bestimmungsgrenze (engl.: Lower Limit of Quantification, Abk.: LLoQ), auch als Assaysensitivität bezeichnet, ist als die geringste zuverlässig quantifizierbare Konzentration des Zielanalyten definiert. Die obere Bestimmungsgrenze (engl.: Upper Limit of Quantification,

Abk.: ULoQ) ist die höchste Analytenkonzentration, die noch zuverlässig quantifiziert werden kann. Die Zuverlässigkeit wird hierbei anhand der erreichten Richtigkeit (engl.: accuracy), ausgedrückt als Wiederfindungsrate oder relativer Fehler, sowie der erreichten Präzision, ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten, bewertet [23, 26, 30]. Behördlichen Richtlinien empfehlen, dass der niedrigste Nicht-Nullstandard der Kalibriergeraden als untere Bestimmungsgrenze und der höchste Kalibrierstandard als obere Bestimmungsgrenze festgelegt werden sollen, erwähnen aber auch die Möglichkeit von sogenannten Ankerpunkten (engl.: anchor points) [23-26]. Bei sigmoidalen Kalibrierkurven, wie für Immunoassays oft die Regel (siehe Kapitel 1.3.2), kann das Einbeziehen von Kalibratoren außerhalb der Bestimmungsgrenzen, entsprechend der genannten Ankerpunkten, von Vorteil bei der Kurvenanpassung sein. Dies kann zu einer höheren Präzision und Richtigkeit führen [27]. Der dynamische Bereich eines Immunoassays ist der Bereich, der die zuverlässige Quantifizierung des Zielanalyten gewährleistet. Der Bereich ist durch die Bestimmungsgrenzen gegeben, für welche die geforderte Präzision und Richtigkeit bestimmt wurden [23-28].

#### **1.3.4 Nachweisgrenze**

Die Nachweisgrenze (engl.: Limit of Detection, Abk.: LoD) eines Immunoassays ist die niedrigste noch qualitativ nachweisbare Analytkonzentration. Sie ist demnach die Konzentration des Analyten, die ein Messsignal generiert, welches sich signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidet. Die Nachweisgrenze wird aus dem mittleren Hintergrundsignal plus zwei- bis dreimal der Standardabweichung des mittleren Hintergrundsignals berechnet [27, 28].

#### **1.3.5 Präzision und Richtigkeit**

Die Präzision eines analytischen Testverfahrens beschreibt die Übereinstimmung bzw. den Grad der Streuung zwischen den Ergebnissen von Messwiederholungen derselben homogenen Probe unter definierten Bedingungen. Ausgedrückt wird die Präzision als das Verhältnis der Standardabweichung der ermittelten Werte zu deren Mittelwert in % (Variationskoeffizient in %). Die Richtigkeit einer analytischen Testmethode beschreibt die Übereinstimmung des Mittelwertes der Ergebnisse der Messwiederholungen mit dem wahren Wert der Messgröße. Die Richtigkeit einer Methode wird ausgedrückt als prozentuale Abweichung der gemessenen mittleren Konzentration von der nominalen Konzentration. Zur Bestimmung der absoluten Richtigkeit sind im besten Falle international anerkannte Referenzstandards verfügbar. Die Bestimmung der beiden Validierungsparameter erfolgt durch Analyse von Qualitätskontrollproben [23-28, 31, 32].

Immunoassays sind messtechnisch bedingt weniger präzise als chromatographische Testmethoden [27, 33]. Aufgrund der größeren Ungenauigkeit können für die Bestimmung der

Präzision eines Immunoassays, im Vergleich zu chromatographischen Methoden (Anzahl  $\geq 3$ ), mehr Validierungsläufe benötigt werden (Anzahl  $\geq 6$ ) [23-27]. Die Präzision von Liganden-Bindungsassays wird unterteilt in Intraassay- (engl.: within-run precision) und Interassay-Präzision (engl.: between-run precision). Die Intraassay-Präzision, ist die Präzision von Wiederholmessungen innerhalb einer Analyse. Die Interassay-Präzision dagegen ist die Präzision zwischen mehreren unabhängigen Analysen [23, 26]. Immunoassays sind indirekt quantitative Messmethoden, da die Quantifizierung über Kalibriergeraden mit Standardproteinen erfolgt (siehe Kapitel 1.3.2). Für viele Analyten sind keine offiziellen internationalen biologischen Referenzstandards z. B. der Weltgesundheitsorganisation vorhanden. Ist dies der Fall, ist nur die Bestimmung der Präzision und der relativen Richtigkeit möglich, jedoch nicht die der absoluten Richtigkeit (siehe auch Kapitel 1.3.6) [28]. Auch die Bestimmung der Richtigkeit kann, analog zur Präzision, innerhalb eines Laufes oder über mehrere unabhängige Läufe bestimmt werden [23, 26].

### **1.3.6 Wiederfindungsrate**

Die Wiederfindungsrate einer Methode beschreibt die Rückgewinnung eines zuvor zur biologischen Matrix zugegeben Analyten im Vergleich zu der nominalen Konzentration in einer nicht biologischen Matrix [24]. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate gibt demnach Rückschlüsse darüber, ob die Signal-Konzentrationsbeziehung in der biologischen Matrix mit der der Kalibrierkurve, hergestellt in Puffer, vergleichbar ist. Eine schlechte Wiederfindungsrate in der biologischen Matrix deutet darauf hin, dass eventuell Matrixeffekte vorliegen. Sie spiegelt auch die Effizienz von Extraktions- und Probenverarbeitungsprozessen wieder [32]. Die Bestimmung der relativen Richtigkeit (siehe Kapitel 1.3.5) kann auch über die Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgen [28]. Das Ergebnis wird angegeben als prozentuale Wiederfindungsrate der mittleren gemessenen Konzentration, bezogen auf die bekannte nominale Konzentration des zugegebenen Analyten, nach Abzug des endogenen Analytlevels [28, 32].

### **1.3.7 Verdünnungslinearität**

Die Bestimmung der Verdünnungslinearität gibt Rückschlüsse darüber, ob der zu bestimmende Analyt in einer Probe mit einer Konzentration oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze nach Verdünnung in den dynamischen Bereich mit ausreichender Richtigkeit quantifiziert werden kann. Demnach wird beschrieben inwieweit die Signal-Konzentrationsbeziehung des Analyten in einer biologischen Matrix nach Verdünnung in Puffer linear ist, wobei hier der Einfluss der Matrix durch starkes Verdünnen vernachlässigbar ist. Gleichzeitig kann das Vorhandensein eines Hook-Effekts, d. h. Unterdrückung des Signals bei Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze, untersucht werden. Bestimmt wird die

Verdünnungslinearität, indem die zu untersuchende biologische Matrix mit Kalibratorprotein, wenn möglich, über den dynamischen Bereich hinaus versetzt und anschließend in Puffer linear verdünnt wird [23, 28, 32].

### **1.3.8 Parallelität**

Die Parallelität zeigt auf, ob die Signal-Konzentrationsbeziehung des endogenen Analyten in der biologischen Matrix nach Verdünnung mit Puffer ausreichend der eingesetzten Ersatzmatrix ähnelt. Es wird demnach untersucht, ob die Bindungseigenschaften des endogenen Proteins an die Antikörper denen des Kalibratorproteins entsprechen. Die Parallelität ähnelt konzeptionell der Verdünnungslinearität. Der wesentliche Unterschied ist jedoch, dass für die Untersuchung der Parallelität die biologische Matrix nicht mit Kalibratorprotein versetzt wird, d. h. untersucht wird lediglich der endogene Analyt. Bestimmt wird die Parallelität, indem die zu untersuchende Matrix mit möglichst hohem endogenen Analytlevel, jedoch unterhalb der oberen Bestimmungsgrenze der Messmethode, mit Puffer verdünnt wird [23, 28, 32]. Die Ergebnisse dieser Parallelitätsexperimente können auch geeignete Verdünnungsbereiche definieren, um ggf. Matrixeffekte zu vermeiden. Demnach kann der minimale Verdünnungsfaktor (engl.: minimal required dilution, Abk.: MRD) bestimmt werden. Weiterhin ist die Parallelität ein wesentliches Experiment, welches die relative Richtigkeit eines Liganden-Bindungsassays charakterisieren kann [28, 34]. Eine wesentliche Abweichung von der Parallelität wäre invalide [28].

### **1.3.9 Analytstabilität**

Die Analytstabilität in der zu analysierenden Matrix wird untersucht, um sicherzustellen, dass Probenvorbereitungsschritte und Lagerbedingungen die Konzentration des Analyten nicht beeinflussen. Sie beschreibt die chemische Stabilität eines Analyten in einer Matrix unter bestimmten Bedingungen über definierte Zeitintervalle. Die Kurzzeitstabilität untersucht die Analytstabilität im Rahmen der im Labor durchgeführten Probenvorbereitungsschritte für die Analyse, i. d. R. bei Raumtemperatur oder bei ca. 4 °C (entspricht z. B. der Lagerung von Proben auf Eis). Die Dauer der Lagerung muss hierbei an die tatsächliche Dauer der jeweiligen Probenvorbereitung angepasst werden, um diese möglichst realitätsnah zu simulieren. Durch mehrfache Analyse einer Probe (z. B. Bestimmung mehrerer Analyten aus einer Probe) können mehrere Einfrier- und Auftauzyklen notwendig werden. Aus diesem Grund ist auch die Stabilität des Analyten in der Matrix im Zuge solcher Zyklen zu untersuchen. Bewertet wird die Stabilität durch die Analyse derselben unbehandelten Probe [23-26, 28, 32].

## 1.4 Zytokine und Procalcitonin

### 1.4.1 Zytokine

Zytokine sind strukturell vielfältige regulatorische Proteine. Sie werden von verschiedenen Zelltypen gebildet u. a. von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen (Abk.: NK-Zellen) und Fibroblasten. Die Bildung erfolgt meist als Reaktion auf einen aktivierenden Reiz. Zytokine dienen der Signalübertragung zwischen Zellen und steuern die Proliferation und Differenzierung der Zellen. Reaktionen werden hierbei durch die Bindung der Zytokine an ihre Rezeptoren ausgelöst. Sie können auf autokrine, parakrine und endokrine Weise wirken. Sie werden im Allgemeinen in die zwei Kategorien, proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine, unterteilt, wobei mehrere Zytokine nicht spezifisch einer dieser beiden Kategorien zuordenbar sind [35, 36].

Näher beschrieben werden im Folgenden die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 und IL-17A.

Interferon-gamma (Abk.: IFN- $\gamma$ ) ist ein Glykoprotein der Klasse der Zytokine bestehend aus 143 Aminosäuren (Abk.: AS). Biologisch aktives IFN- $\gamma$  ist ein nicht-kovalent gebundenes Homodimer aus zwei identisch glykosylierten Polypeptidketten in antiparalleler Orientierung [37-40]. Der IFN- $\gamma$ -Rezeptor ist ein Heterodimer bestehend aus zwei Untereinheiten, Rezeptor 1 (Abk.: IFNGR1) und 2 (Abk.: IFNGR2) [35, 40]. Die Produktion von IFN- $\gamma$  erfolgt durch stimulierte Lymphozyten und NK-Zellen [40, 41]. Des Weiteren können Zytokine (z. B. IL-12 und IL-18) die Produktion von IFN- $\gamma$  stimulieren [39, 42-44]. Die Erkennung vieler Pathogene durch Makrophagen induziert die Sekretion von IL-12 und Chemokinen (z. B. Makrophagen-entzündliches Protein-1). Diese Chemokine locken NK-Zellen an den Entzündungsort und IL-12 fördert die Synthese von IFN- $\gamma$  in diesen Zellen [39, 44-46]. Ein negativer Regulator ist u. a. IL-4 [46]. IFN- $\gamma$  ist das einzige Interferon vom Typ II und unterscheidet sich serologisch von Interferonen vom Typ I; es ist säureinstabil, während die Varianten vom Typ I säurestabil sind. IFN- $\gamma$  hat antivirale, antiproliferative, immunmodulierende sowie antitumorale Eigenschaften. IFN- $\gamma$  besitzt die biologische Aktivität der Makrophagenaktivierung und erhöht die Expression von MHC-Molekülen und antigenprozessierender-Zellen. Des Weiteren spielt es eine Rolle im Immunglobulin-Klassenwechsel und bei der Unterdrückung von T-Helferzellen (Abk.: T<sub>H</sub>) Typ 17 und Typ 2 [35, 39, 40].

Interleukin 2 (Abk.: IL-2, Synonym: T-Zell-Wachstumsfaktor) ist ein Glykoprotein (Monomer) aus der Klasse der Zytokine bestehend aus 133 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 14 bis 17 kDa. Der IL-2-Rezeptor (Abk.: IL-2R) ist ein Heterotrimer bestehend aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma_c$ -Ketten. Es wird von aktivierten T-Zellen, hauptsächlich CD<sub>4</sub><sup>+</sup>- und zu einem geringeren Anteil auch von CD<sub>8</sub><sup>+</sup>-T-Zellen, produziert. Nach Antigenstimulation und aktivierter IL-2 Synthese kommt es innerhalb von ca. 4 h zur maximalen und i. d. R. transienten IL-2 Sekretion. Nach Sekretion erfolgt eine autokrine Stimulation von T-Zellen und dadurch eine klonale Expansion. IL-2 regt zudem die Proliferation und Differenzierung von B- und T-

Lymphozyten an und stimuliert die Bildung weiterer Zytokine. [35, 40, 47].

Interleukin 10 (Abk.: IL-10) ist ein Protein aus der Klasse der Zytokine bestehend aus 160 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 18,5 kDa. Es liegt als Homodimer vor, wobei ein nicht-kovalent gebundenes v-förmiges Dimer gebildet wird [35, 48]. Der IL-10-Rezeptor (Abk.: IL-10R) setzt sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Abk.: IL-10R $\alpha$  bzw. IL-10R $\beta$ ) zusammen. IL-10R $\alpha$  bindet das IL-10 Protein an der Zelloberfläche und IL-10R $\beta$  ist Teil der Signaltransduktion [49]. Strukturelle Homologien zeigen IL-10 und der IL-10-Rezeptor mit INF- $\gamma$  bzw. dem INF- $\gamma$ -Rezeptor auf [48]. IL-10 wird von verschiedenen Zelltypen sezerniert u. a. von Makrophagen/Monozyten, CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-T-Zellen, B-Lymphozyten, eosinophile Leukozyten und Keratinocyten [35, 50, 51]. Es ist ein entzündungshemmendes antiinflammatorisches Zytokin, das eine entscheidende Rolle bei der Hemmung, Begrenzung bzw. Prävention von Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen spielt. Es hemmt aktivierte Makrophagen und antigenstimulierte T<sub>H</sub>-1 Zellen und inhibiert die Produktion von proinflammatorischen Faktoren (u. a. IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ ) [52-54]. Des weiteren induziert IL-10 die Synthese weiterer antiinflammatorischer Moleküle [55]. Auch proinflammatorische IL-10 Effekte sind beschrieben. IL-10 bedingt hierbei eine erhöhte Antikörperproduktion [56-58].

Interleukin 17A (Abk.: IL-17A) ist ein Glykoprotein aus der Familie der Zytokine bestehend aus 150 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 18 kDa. IL-17A liegt u. a. als disulfid-verknüpftes Homodimer vor [35, 59]. Es gehört zu einer Familie, die aus sechs (IL17 A-F) bisher identifizierten Proteinen besteht. Dabei besteht die höchste Homologie mit 55 % zwischen IL-17A und IL-17F [59, 60]. IL-17A und IL-17F können auch Heterodimere bilden [59]. IL-17A bindet an zwei Rezeptoren (Abk.: IL-17R), an IL-17RA und IL-17RC [61, 62]. IL-17A ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird primär von T<sub>H</sub>17-Zellen produziert, jedoch auch von u. a. CD<sub>8</sub><sup>+</sup>-T-Zellen, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten. Nach Bindung von IL-17A an die Rezeptoren werden proinflammatorische Zytokine, Mediatoren und Chemokine freigesetzt, was zur Pathogenese verschiedener Autoimmun- und Entzündungskrankheiten beiträgt [35, 62, 63]. Es spielt eine Rolle bei einigen Erkrankungen, darunter u. a. rheumatoide Arthritis, Asthma bronchiale, Psoriasis und Multiple Sklerose [59, 62].

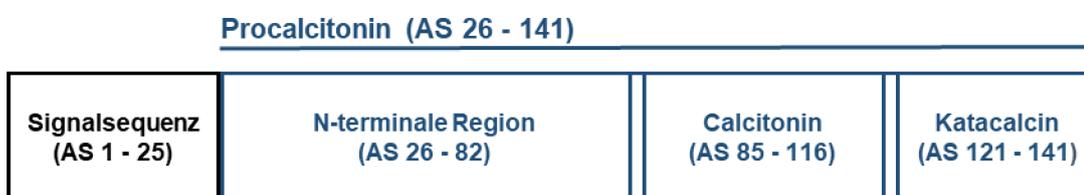
Zytokine sind wichtige Biomarker und Indikatoren für physiologische oder pathologische Prozesse [8]. Beispielsweise sind deregulierte Zytokine an einem breiten Spektrum von Krankheiten beteiligt und werden routinemäßig als Biomarker für verschiedene Arzneimittelentwicklungsprogramme eingesetzt [64]. Die Freisetzung von Zytokinen in das extrazelluläre Milieu führt zu ihrer Verdünnung, weswegen viele Zytokine typischerweise nur in niedrigen pg·mL<sup>-1</sup>- bis sub- pg·mL<sup>-1</sup>-Konzentrationen im menschlichen Blut vorhanden sind. Sie lassen sich mit herkömmlichen ELISAs oder noch empfindlicheren Ligandenbindungsassays (Abk.: LBA) nur schwer quantifizieren, da die Konzentration der meisten Zytokine unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze der meisten Analysemethoden

liegt. Der Einsatz hochsensitiver Technologien (z. B. Simoa- oder SMC-Technologie) kann dazu beitragen Zytokinkonzentrationen bis in den sub-  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ -Konzentrationsbereich quantifizieren zu können, was die Aussagekraft der Zytokine als Biomarker weiter erhöhen könnte [8, 65].

#### 1.4.2 Procalcitonin

Procalcitonin (Abk.: PCT) ist ein gut etablierter Biomarker für die klinische Diagnose bakterieller, parasitärer oder mykotischer Infektionen [66-69]. Es wurde erstmals 1993 in erhöhten Konzentrationen im Serum von Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen gemessen ohne nachweisbare gleichzeitige Erhöhung des Calcitoninlevels [66]. PCT (Abbildung 5) ist eine Vorstufe des Hormons Calcitonin und besteht aus 116 Aminosäuren. Unter physiologischen Bedingungen wird PCT in sehr geringen Konzentrationen ( $< 0,05 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) posttranslational in den C-Zellen der Schilddrüse in Calcitonin, Katalcalcin und in ein N-terminales Ende gespalten und sezerniert [70, 71]. Das durch systemische bakterielle und parasitäre Infektionen sezernierte PCT kann jedoch nur teilweise aus den C-Zellen der Schilddrüse stammen, da selbst bei Thyreoidektomie-Patienten mit einer Sepsis große Mengen PCT nachgewiesen werden konnten [66]. Verschiedene Gewebe, u. a. Leber, Lunge, Nieren, Nebennieren, Prostata, Dünndarm und Hoden sowie periphere mononukleare Blutzellen und Granulozyten, produzieren nachweislich PCT [72]. In einem Sepsismodell wurde entdeckt, dass keine PCT-Produktion bei einer Leberresektion nachweisbar war, was darauf hinwies, dass die Leber die Hauptquelle von PCT während der Infektion sein könnte [72, 73]. In den frühen Stadien proinflammatorischer Zustände wird PCT von Zytokin-aktivierten Makrophagen (IL-6, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) freigesetzt und interagiert dabei mit den Endothelzellen [74, 75].

#### Preprocalcitonin (AS 1 - 141)



**Abbildung 5: Schematische Darstellung von Preprocalcitonin und Calcitonin.**

„AS“ = Aminosäure. Erstellt basierend auf [70].

Die dann im Blut vorliegenden proinflammatorischen Mediatoren initiieren die weitere PCT-Produktion und Freisetzung im Parenchym verschiedener Organe, was zu einer 10.000- bis 100.000-fachen Erhöhung der PCT-Plasmakonzentration führt [76]. Dies macht PCT zu einem sehr wertvollen Biomarker für den Nachweis bakterieller Infektionen, wie bakterielle Sepsis, Blutbahninfektionen und Infektionen der Atemwege oder verschiedener anderer menschlicher

Organe [66-69]. Die PCT-Bestimmung wurde ebenfalls als wichtige Analyse für die Auswahl von Antibiotika zur Behandlung bakterieller Infektionen beschrieben. Sie kann demnach dazu beitragen die Verschreibungsrate von Antibiotika zu reduzieren und die Dauer des Antibiotikaeinsatzes zu bewerten [77]. Die verfügbaren diagnostischen Assays schneiden innerhalb des derzeit angestrebten klinisch relevanten PCT-Konzentrationsbereichs gut ab. Mehrere der kommerziell erhältlichen PCT-Assays auf verschiedenen klinischen Plattformen basieren auf Reagenzien eines einzigen Anbieters [75] und die untere Nachweisgrenzen variieren je nach der verwendeten Immunoassay-Technologie zwischen ca. 10,0 und 170 pg·mL<sup>-1</sup> [78].

## **1.5 Rolle von Zytokinen und PCT bei der Diagnose von Meningitis und bei der Optimierung von Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport**

### **1.5.1 Meningitis**

Als Meningitis, auch Hirnhautentzündung genannt, wird eine Entzündung der Meningen, d. h. der Bindegewebsschicht die das Gehirn und das Rückenmark umschließen, bezeichnet. Betroffen sind dabei die Arachnoidea, die Pia mater und die sich dazwischen befindliche Zerebrospinalflüssigkeit (engl.: Cerebrospinal fluid, Abk.: CSF). Der Entzündungsprozess kann sich über den gesamten Subarachnoidalraum um das Gehirn, das Rückenmark und die Ventrikel erstrecken [79, 80]. Das Krankheitsbild der Meningitis wird in zwei Arten unterteilt, die bakterielle und die aseptische Meningitis. Die bakterielle Meningitis, auch als akut eitrige Meningitis bezeichnet, ist eine Entzündung als Folge einer bakteriellen Infektion, die i. d. R. eine granulozytäre Antwort in der Zerebrospinalflüssigkeit hervorruft. Die aseptische Meningitis (nicht eitrige Meningitis) ist eine nicht bakteriell bedingte Infektion der Meningen. Diese Art wird zudem in eine nicht-bakterielle und eine nicht-infektiöse Meningitis klassifiziert. Die nicht-bakterielle Meningitis wird häufig von Viren oder anderen Mikroorganismen (z. B. Pilze) verursacht. Die nicht-infektiöse Meningitis wird wiederum häufig durch toxische Stoffe oder systemischen bzw. neoplastischen Krankheiten ausgelöst [79]. Die akute bakteriell verursachte Meningitis ist ein medizinischer Notfall, der eine schnelle intensivmedizinische Behandlung bedarf. [81]. Eine viral verursachte Meningitis ist meist weniger akut und heilt häufig spontan ab [82], jedoch sind auch u. a. bei der Frühsommer-Meningoencephalitis (Abk.: FSME) schwere Verlaufsformen bekannt [83]. Als häufigste Erreger der bakteriellen Meningitis galten *Haemophilus influenzae Typ b*, *Streptococcus pneumoniae* (Abk.: *S. pneumoniae*) und *Neisseria meningitidis*. Die durch den Erreger *Haemophilus influenzae Typ b* bedingte Meningitis wurde in der westlichen Welt seit Beginn der Impfung gegen den Erreger eliminiert [84, 85]. Heute ist der häufigste Erreger *S. pneumoniae*. Die häufigste Ursache für eine nicht-

bakterielle Meningitis sind Enteroviren [82, 86, 87]. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigen das proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (Abk.: TNF- $\alpha$ ), IL-8, IL-1 und IL-6 sowie die entzündungshemmenden Mediatoren IL-10 und der transformierende Wachstumsfaktor-beta (Abk.: TGF- $\beta$ ) an der Pathophysiologie der bakteriellen Meningitis beteiligt sind und z. B. IL-1, IL-10, IL-6 und TNF- $\alpha$  bei Erkrankung in erhöhter Konzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit nachweisbar sind. Es entsteht ein komplexes Interaktionsnetzwerk wobei die Zytokine pro- und antiinflammatorisch wirken können [88-91]. Umgekehrt wird die PCT-Produktion durch Interferon- $\gamma$  abgeschwächt, das primär als Reaktion auf eine Virusinfektion sezerniert wird [92].

Wie bereits beschrieben (Kapitel 1.4.2), besitzt PCT einen diagnostischen Wert für die Diagnostik einer z. B. bakteriellen Sepsis. Verschiedene Arbeitsgruppen haben den diagnostischen Wert von PCT untersucht und die Aussagekraft von PCT für die Differenzierung zwischen einer bakteriellen und einer aseptischen Meningitis (insbesondere virale Meningitis) evaluiert. Ein solcher Marker wäre von großem Wert, da eine frühzeitige Erkennung einer bakteriellen bzw. viralen Meningitis entscheidend für die rechtzeitige Einleitung einer Behandlung und zur Verbesserung der Prognose ist. Des Weiteren könnte eine zuverlässige Methode der Diskriminierung der beiden Meningitis-Arten helfen, eine nicht benötigte Antibiotikabehandlung einzuschränken. Eine Literaturrecherche (Velissaris D. et al., 2018; [93]) der aktuell veröffentlichten Literatur über die Verwendung von PCT als diagnostischer Marker bei Erwachsenen mit Meningitis, unter Einbezug von 38 Publikationen, kam zur Schlussfolgerung, dass die Daten zu Procalcitonin in der Zerebrospinalflüssigkeit begrenzt sind. Dahingegen zeigten die veröffentlichten Daten, dass das Serum-PCT, im Vergleich zu anderen Markern, ein besserer Sepsis-Biomarker bei einer akuten Meningitis ist und helfen kann, eine bakterielle von einer viralen Meningitis zu unterscheiden [93].

### **1.5.2 Optimierung von Belastungs- und Anpassungsmanagement im Spitzensport**

International konkurrenzfähiger Spitzensport ist über Belastungs- und Anpassungsmanagement möglich, bedingt aber eine mittel- und langfristig effizientere und auf die individuellen Bedürfnisse angepasste Methodik der Trainings- und Wettkampfsteuerung. Hierfür ist die Aufklärung der komplexen Prozesse, die die Anpassungsfähigkeit des menschlichen Körpers an spezifische Trainingsreize bestimmen, entscheidend für die Verbesserung der sportlichen Leistung [94]. Die Reaktionen auf Bewegung, systemische und physiologische Reize, sind komplex und noch nicht gut verstanden. Sie umfassen ein breites Spektrum von metabolischen, immunologischen und hormonellen Veränderungen. Bekannt ist, dass die systematische Reaktion auf akute Belastung abhängig von der Art, Dauer und Intensität der Belastung ist [94, 95]. Verschiedene Forschungsgruppen untersuchen die spezifischen Reaktionen auf verschiedene Belastungen unter Berücksichtigung der

trainingsinduzierten Reaktionen von Zytokinen [94, 96-98]. Zum Beispiel steigt bei Ausdauerbelastungen unterschiedlicher Arten die IL-6 Konzentration um das 1- bis 100-Fache an, wohingegen kurze Übungsdauern oder geringe Intensitäten der Belastungen zu keiner Erhöhung der IL-6 Konzentrationen führten [99]. Unterschiedliche Studien berichten über erhöhte Konzentrationen von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-1RA, IL-10, IL-12p40, IL-4 und MCP-1 nach verschiedenen Belastungsarten, einschließlich kurzer maximaler Belastung [100, 101], Widerstandstraining [100, 102-104], intensives exzentrisches Radfahren [105] und Marathon bzw. Triathlon [98, 100, 106, 107]. Neben der Vermittlung von immunologischen Reaktionen wurden verschiedene nicht-immunologische Funktionen bzw. Prozesse beschrieben (u. a. Prozess der Muskelveränderung bzw. -anpassung auf zellulärer Ebene), die von bestimmtem Zytokinen (z. B. IL-6) beeinflusst werden [108, 109]. Untersuchungen zu einem Zusammenhang zwischen der PCT-Konzentration im Blut und sportlicher Belastung weisen darauf hin, dass Belastungen das PCT-Niveau beeinflussen, PCT aber erst 4 h nach der Belastung nachweisbar ist und 8-24 h nach der Belastung ein Plateau erreicht wird [110-112].

## 2 Zielsetzung

Proteinbiomarker sind wichtige Indikatoren für physiologische oder pathologische Prozesse. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Prognose und Diagnose von Krankheiten bzw. biologischen Prozessen und sind auch wichtiger Bestandteil in der Arzneimittelentwicklung. Viele dieser Biomarker liegen z. B. im menschlichen Blut jedoch in sehr niedrigen Konzentrationen vor und lassen sich mit herkömmlichen Immunoassays (gebräuchlichste Analysemethode), aufgrund der fehlenden Sensitivität oftmals nicht quantifizieren. Es kommt also häufig vor, dass Biomarker-Messungen in biologischen Flüssigkeiten (z. B. Serum, Plasma, Liquor) unter die Bestimmungsgrenze fallen, wodurch quantitative Analysen und die Interpretation von Biomarker-Ergebnissen beeinträchtigt werden. Diese fehlende Sensitivität führte in den vergangenen Jahren und Jahrzehnte zur Entwicklung von Immunoassay-Technologien mit gesteigerten Sensitivitäten, wie der Single Molecule Array (Simoa) - Technologie der Firma Quanterix.

Die Simoa-Technologie ist eine Mikrosphären-basierte hoche sensitive Immunoassay-Plattform. Die Sensitivitätssteigerung basiert auf der Detektion von einzelnen enzymmarkierten Immunkomplexen, unter anderem aufgrund eines stark reduzierten Reaktionsraumes und durch eine enzymatische Signalamplifikation, analog zum klassischen ELISA. Dies führt zu Sensitivitätssteigerungen um den Faktor 10 bis 100 und ermöglicht die Proteinbestimmung bis in den niedrigen  $\text{fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ -Konzentrationsbereich. Diese nun erreichbaren Sensitivitäten könnten dabei helfen neue diagnostische Biomarker zu identifizieren und deren Aussagekraft durch die Detektion von sehr geringen Konzentrationsänderungen, beziehungsweise der Analyse von niedrigsten Analytkonzentrationen, zu verbessern.

Ziel dieser Arbeit war es fünf hoche sensitive Simoa-Immunoassays für die Quantifizierung von Interferon- $\gamma$ , Interleukin-2, Interleukin-10, Interleukin-17A und Procalcitonin zu entwickeln, die eine schnelle, präzise und sensitive Bestimmung dieser Analyten in Plasma, Serum und CSF ermöglichen sollten. Nach der Entwicklung der fünf hoche sensitiven Simoa-Assays sollten diese validiert werden, um die Qualität und die Eignung zur Quantifizierung der Analyten zu prüfen.

Mit den entwickelten und validierten hoche sensitiven Assays sollte die Anwendbarkeit zur Bestimmung der Analytkonzentrationen in humanen Proben gesunder Spender geprüft werden. Um zwischen gesunden und kranken Zuständen unterscheiden zu können, sind solche Referenzbereiche von großer Bedeutung und durch die gesteigerte Sensitivität nun ggf. erfassbar.

Anschließend sollte die Eignung der Analyten als Biomarker unter Verwendung der entwickelten Simoa-Assays durch Analyse verschiedener Patientenproben gezeigt werden. Anhand von Patientenproben mit diagnostizierter bakterieller oder viraler Meningitis sollte

untersucht werden, inwiefern die PCT-Konzentrationsbestimmung im niedrigen  $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ -Konzentrationsbereich es ermöglichen könnten, PCT auch als Biomarker für eine virale Meningitis im Rahmen der Diagnose der Erkrankung einzusetzen. Hierzu sollte untersucht werden, ob es signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit diagnostizierter viraler Meningitis, diagnostizierter bakterieller Meningitis und gesunden Spender gibt.

Abschließend sollte untersucht werden, ob die durch den Einsatz der entwickelten Simoa-Assays erhöhte Sensitivität es ermöglicht, neue Biomarker zur Identifikation von Trainings- und Belastungsprozesses bei Sportlern zu identifizieren.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Antikörper

**Tabelle 3: Antikörper.**

„hu“ = human, „MK“ = Monoklonal, „PK“ = Polyklonal

Analyt	Bezeichnung	Spezies	Klonalität	Klon	Hersteller
$\alpha$ -hu IFN- $\gamma$	FA1	Maus	MK	25718	R&D Systems (Minneapolis, MN, US)
$\alpha$ -hu IFN- $\gamma$	FA2	Maus	MK	2G1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US)
$\alpha$ -hu IFN- $\gamma$	DA1	Ziege	PK	NA	R&D Systems
$\alpha$ -hu IFN- $\gamma$	DA2	Maus	MK	B133.5	Thermo Fisher Scientific
$\alpha$ -hu IL-2	FA1	Maus	MK	5344.111	BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, US)
$\alpha$ -hu IL-2	FA2	Ratte	MK	MQ1-17H12	BD Pharmingen
$\alpha$ -hu IL-2	FA3	Maus	MK	5355	R&D Systems
$\alpha$ -hu IL-10	FA1	Ratte	MK	JES3-9D7	BD Pharmingen
$\alpha$ -hu IL-10	FA2	Ratte	MK	JES3-19F1	BD Pharmingen
$\alpha$ -hu IL-10	FA3	Maus	MK	127107	R&D Systems
$\alpha$ -hu IL-10	DA2	Ratte	MK	JES3-12G8	Thermo Fisher Scientific
$\alpha$ -hu IL-10	DA3	Ziege	PK	NA	R&D Systems
$\alpha$ -hu IL-17A	FA1	Maus	MK	BL23	Biolegend (San Diego, CA, US)
$\alpha$ -hu IL-17A	FA2	Maus	MK	MT44.6	Mabtech (Nacka Strand, SE)
$\alpha$ -hu IL-17A	FA3	Maus	MK	41809	R&D Systems
$\alpha$ -hu PCT	FA1/DA2	Ratte	MK	4A6	Helmholtz Zentrum München (München DE)
$\alpha$ -hu PCT	FA2/DA1	Ratte	MK	2F3	Helmholtz Zentrum München

**Tabelle 4: Antikörper mit Biotin-Konjugat.**

„hu“ = human, „MK“ = Monoklonal, „PK“ = Polyklonal

Analyt	Bezeichnung	Spezies	Klonalität	Klon	Hersteller
$\alpha$ -hu IFN- $\gamma$	DA3	Maus	MK	67F12A8	Thermo Fisher Scientific
$\alpha$ -hu IL-2	DA1	Maus	MK	B33-2	BD Pharmingen
$\alpha$ -hu IL-2	DA2	Ziege	PK	NA	R&D Systems
$\alpha$ -hu IL-10	DA1	Ratte	MK	JES3-12G8	BD Pharmingen
$\alpha$ -hu IL-17A	DA1	Ziege	PK	NA	Biolegend
$\alpha$ -hu IL-17A	DA2	Maus	MK	MT504	Mabtech
$\alpha$ -hu IL-17A	DA3	Ziege	PK	NA	R&D Systems

##### 3.1.2 Rekombinante Proteine und WHO-Referenzmaterial

**Tabelle 5: Rekombinante Proteine.**

Analyt	Beschreibung	Produkt-Nr.	Hersteller
Human IFN- $\gamma$	<i>E. coli</i> exprimiert (Gln24-Gln166)	285-IF-100	R&D Systems
Human IL-2	<i>E. coli</i> exprimiert (Ala21-Thr153)	202-IL-010	R&D Systems
Human IL-10	<i>E. coli</i> exprimiert (Ser19-Asn178)	1064-IL-010	R&D Systems
Human IL-17A	<i>E. coli</i> exprimiert (Ile20-Ala155)	317-ILB-050	R&D Systems
Human PCT	<i>E. coli</i> exprimiert (Sequenz nicht bekannt)	30-1908	Fitzgerald (Acton, MA, US)

**Tabelle 6: WHO-Referenzmaterial.**

Analyt	Beschreibung	Produkt-Nr.	Hersteller
Human IL-2	WHO Internationaler Standard (Human rDNS abgeleitet, IL-2 Protein <i>E.coli</i> exprimiert, Sequenz nicht bekannt)	86/500	NIBSC (South Mimms, UK)
Human IL-10	WHO Internationaler Standard (Human rDNS abgeleitet, IL-10 Protein <i>E.coli</i> exprimiert, Sequenz nicht bekannt)	93/722	NIBSC
Human IL-17A	WHO Internationaler Standard (Human rDNS abgeleitet, IL-17A Protein <i>E.coli</i> exprimiert, Sequenz nicht bekannt)	01/420	NIBSC

### 3.1.3 Humanes und tierisches Plasma

**Tabelle 7: Humanes Plasma.**

Name	Beschreibung	Hersteller / Vertrieb
Human Plasma 1	Gepooltes Human-K2-EDTA-Plasma (weibliche + männliche Spender)	Sera Laboratories (Haywards Heath, UK)
Human Plasma 2	Gepooltes Human-K2-EDTA-Plasma (weibliche + männliche Spender)	Innovative Research (Novi, MI, US)

**Tabelle 8: Tierisches Plasma.**

Name	Beschreibung	Hersteller / Vertrieb
Schweineplasma (porcines Plasma)	Gepooltes Schweine-K2-EDTA-Plasma von (weibliche + männliche Tiere)	Sera Laboratories
Rinderplasma (bovines Plasma)	Gepooltes Rinder-K2-EDTA-Plasma (weibliche + männliche Tiere)	Sera Laboratories
Schafsplasma (ovines Plasma)	Gepooltes Schafs-K2-EDTA-Plasma (weibliche + männliche Tiere)	Sera Laboratories

### 3.1.4 Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 9: Reagenzien und Chemikalien.**

Reagenz / Chemikalie	Hersteller / Vertrieb
Bovines Serum Albumin (BSA)	Proliant Biologicals (Ankeny, IA, US)
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Thermo Fisher Scientific
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Glycerin	Sigma-Aldrich
NHS-PEG <sub>4</sub> -Biotin	Thermo Fisher Scientific
Proclin300	Thermo Fisher Scientific
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Fisher Scientific (Hampton, NH, US)
Resorufin $\beta$ -D-Galaktopyranosid (RGP)	Quanterix (Lexington, MA, US)
Sulfo-N-hydroxysuccinimid (sNHS),	Thermo Fisher Scientific
Streptavidin- $\beta$ -galaktosidase (SBG)	Quanterix
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween-20)	Sigma-Aldrich
Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether (Triton X-100)	Sigma-Aldrich

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien.**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller / Vertrieb
96-Kavitäten-Platte für KingFisher (tief)	Thermo Fisher Scientific
Filtropur S 0,2	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Reaktionsgefäße, 1,5 mL	Vetter (Ammerbuch, DE)
Simoa-Auslesediscs	Quanterix
Simoa-Küvetten	Quanterix
Simoa-Reagenzienflaschen	Quanterix
Simoa-Spitzen (leitfähig)	Quanterix
Simoa-Öl	Quanterix
96 Kavitäten-Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugalkonzentratoren, 100 kDa	Merck (Darmstadt, DE)

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

**Tabelle 11: Puffer und Lösungen.**

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung / Hersteller
Aktivierungsmix 1	0,5 mg·mL <sup>-1</sup> EDC in Immobilisierungspuffer
Aktivierungsmix 2	5,0 mg·mL <sup>-1</sup> EDC + 5,0 mg·mL <sup>-1</sup> sNHS in Immobilisierungspuffer
Aktivierungsmix 3	5,0 mg·mL <sup>-1</sup> EDC + 0,01 % Triton X-100 (v/v) in Immobilisierungspuffer
Aktivierungsmix 4	5,0 mg·mL <sup>-1</sup> EDC + 5,0 mg·mL <sup>-1</sup> sNHS + 0,01 % Triton X-100 (v/v) Immobilisierungspuffer
Blockierungspuffer	Quanterix (Zusammensetzung nicht verfügbar)
Biotinylierungspuffer	Quanterix (Zusammensetzung nicht verfügbar)
Detektionsantikörperlagerpuffer	Biotinylierungspuffer + 0,05 % ProClin300 (v/v)
Detektionsantikörperverdünnungspuffer	Quanterix (Zusammensetzung nicht verfügbar)
Immobilisierungspuffer	Quanterix (Zusammensetzung nicht verfügbar)
Immobilisierungspuffer 2	Immobilisierungspuffer + 0,01 % Triton X-100 (v/v)
Mikrosphärenpuffer	Quanterix (Zusammensetzung nicht verfügbar)
Mikrosphärenlagerspuffer	Mikrosphärenpuffer + 0,05 % ProClin300 (v/v)
SBG-Verdünnungspuffer	Quanterix (Zusammensetzung nicht verfügbar)
Waschpuffer	Quanterix (Zusammensetzung nicht verfügbar)

### 3.1.7 Geräte und Software

**Tabelle 12: Geräte.**

Geräte	Hersteller
DynaMag-Spin Magnet	Thermo Fisher Scientific
HD-1 Analysegerät	Quanterix
Hula Mixer	Thermo Fisher Scientific
KingFisher 96 / KingFisher Flex	Thermo Fisher Scientific
Mikrozentrifuge, MiniStar silverline	VWR (Darmstadt, DE)
pH-Meter 766	Knick (Berlin, DE)
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic (Berlin, DE)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, US)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

**Tabelle 13: Software.**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
BindIt Software 3.1	Thermo Fisher Scientific
Simo HD-1, Version 1.3 + 1.5	Quanterix
EndNote X7	Clarivate Analytics (Philadelphia, PA, US)
OriginPro 2015G	Additive (Friedrichsdorf, DE)
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation (Redmond, WA, US)
XLfit 5.3.1.3	IDBS (Guildford, UK)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Simoa-Immunoassay – Herstellung der Assayreagenzien

#### 3.2.1.1 Immobilisierung von Antikörpern

Die Immobilisierung von Fängerantikörper erfolgt auf paramagnetische Mikrosphären (Abk.: MP) mit Hilfe einer Carboxylgruppen-funktionalisierten Oberfläche. Nach Aktivierung der Carboxylgruppen mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (Abk.: EDC) können Proteine, u. a. Antikörper, kovalent über ihre Aminogruppen an der Mikrosphärenoberfläche immobilisiert werden.

EDC reagiert mit den Carboxylgruppen zu einem O-Acylisoharnstoff-Zwischenprodukt, welches mit einem primären Amin (beispielsweise in Proteinen) eine stabile Amidbindung bilden kann. Für die Stabilisierung des in wässriger Lösung instabilen O-Acylisoharnstoffs, kann die Immobilisierung in einer Zwei-Schritt-Reaktion unter Verwendung von EDC und Sulfo-N-hydroxysuccinimid (Abk.: sNHS) durchgeführt werden [113]. Der Aktivester reagiert mit einer primären Aminogruppe unter Ausbildung einer Amidbindung und Freisetzung des verwendeten sNHS.

Um das Reaktionsmilieu vor Beginn der Immobilisierung auf einen konstanten pH-Wert einzustellen, wurde ein Pufferaustausch der Antikörperlösungen durchgeführt. Dies wurde mit Zentrifugalkonzentratoren (Amicon Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters, Merck) nach Herstellerprotokoll und mit 120 µg Antikörper durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte abweichend vom Herstellerprotokoll bei 4 °C. Der Antikörperlagerpuffer (herstellerabhängig) wurde durch Immobilisierungspuffer ausgetauscht. Die Antikörperkonzentration wurde mittels UV/VIS Messung bei 280 nm ( $\epsilon = 1,4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) bestimmt und mit Immobilisierungspuffer auf  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  eingestellt.

Anschließend erfolgte die Aktivierung der Mikrosphären mit EDC (Immobilisierungsmethode 1) oder EDC/sNHS (Immobilisierungsmethode 2), gefolgt von der Immobilisierungsreaktion und einem Blockierungsschritt der Mikrosphären mit einer proteinhaltigen Lösung. Hierfür wurde die Mikrosphären-Stocklösung 10 s gemischt (Vortexer) und 30 s im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden in ein Reaktionsgefäß  $2,98 \cdot 10^8$  Mikrosphären überführt und dreimal mit 200 µL Waschpuffer 1 und zweimal mit 200 µL Immobilisierungspuffer gewaschen. Alle beschriebenen Waschschrte wurden mit Hilfe eines Magneten (z. B. DynaMag-Spin Magnet, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die paramagnetischen Mikrosphären werden hierbei mittels Magnet pelletiert (10 s) und anschließend der Überstand abgenommen. Für die Immobilisierungsmethode 1 wurden 200 µL Aktivierungsmix 1 und für die Immobilisierungsmethode 2 wurden 200 µL Aktivierungsmix 2 zu den Mikrosphären gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 min bei RT im Hula-Mixer. Nach der Aktivierung wurden die Mikrosphären zweimal mit 200 µL Immobilisierungspuffer gewaschen, der

Überstand abgenommen und 200  $\mu\text{L}$  Antikörperlösung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur (Abk.: RT) im Hula-Mixer. Nach dem Immobilisierungsschritt wurden die Mikrosphären mit 200  $\mu\text{L}$  Waschpuffer gewaschen, der Überstand abgenommen und 200  $\mu\text{L}$  Blockierungspuffer hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT im Hula-Mixer. Anschließend wurden die Mikrosphären zweimal mit 200  $\mu\text{L}$  Waschpuffer, einmal mit 200  $\mu\text{L}$  Mikrosphärenlagerpuffer gewaschen und in 200  $\mu\text{L}$  Mikrosphärenlagerpuffer aufgenommen. Die Lagerung der Mikrosphären erfolgt bei 2 bis 8  $^{\circ}\text{C}$ .

Der Übertrag des händischen Protokolls der Immobilisierung auf einen semi-automatisierten Prozess erfolgte mittels eines Magnetpartikelprozessors (KingFisher System, Thermo Fisher Scientific). Hierbei werden paramagnetische Mikrosphären mit Hilfe eines Magnetkamms zwischen acht Mikrotiterplatten transferiert.

Für die Immobilisierung mit dem KingFisher Magnetpartikelprozessor wurde das Verhältnis zwischen Antikörpermenge und Mikrosphärenzahl (100  $\mu\text{g}$  Antikörper auf  $2,98 \cdot 10^8$  Mikrosphären) identisch zur manuellen Immobilisierung eingesetzt. Die Inkubationszeiten der Aktivierung, Immobilisierung und Blockierung blieben ebenfalls dieselben. Alle benötigten Reagenzien, wie Antikörperlösung, Aktivierungsmix, Blockierungspuffer und Waschlösungen wurden in 96-Kavitäten-Platten (1,2 mL Fassungsvermögen einer Kavität) vorgelegt. Die Aktivierung der Mikrosphären erfolgte mit 200  $\mu\text{L}$  Aktivierungsmix 3 oder Aktivierungsmix 4. Die Volumina der Waschlösungen wurden von 200  $\mu\text{L}$  auf 400  $\mu\text{L}$  erhöht und die Waschschrte mit Immobilisierungspuffer 2 oder Waschpuffer durchgeführt (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Plattenbelegung für die Immobilisierung mit dem KingFisher System.**

Platten-Nr.	Protokoll-Nr.	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Inhalt	Funktion
1	1	300	$8,4 \times 10^8$ Mikrosphären in Waschpuffer	Sammeln der Mikrosphären
2	1	400	Waschpuffer	Waschen
3	1	400	Waschpuffer	Waschen
4	1	400	Immobilisierungspuffer 2	Waschen
5	1 und 2	400	Immobilisierungspuffer 2	Waschen
6	2	200	Aktivierungsmix 3 oder 4	Aktivierung der Mikrosphären
7	2	400	Immobilisierungspuffer 2	Wasche
8	2	400	Immobilisierungspuffer 2	Waschen
9	2	200	Antikörper-Lösung	Immobilisierung von Antikörpern
10	2	400	Waschpuffer	Waschen
11	2	400	Waschpuffer	Waschen
12	2	400	Blockierungspuffer	Blockierung und Abgabe der Mikrosphären

Der Immobilisierungsprozess wurde mit zwei nacheinander ausgeführten KingFisher-Protokollen durchgeführt (maximale Anzahl an Plattenpositionen im KingFisher = 8). In einem letzten Schritt wurden die Mikrosphären manuell aus Platte-Nr. 12 in ein 1,5 mL

Reaktionsgefäß überführt, jeweils mit 200 µL Waschpuffer (zweimal) und Mikrosphärenlagerpuffer (einmal) gewaschen und in 200 µL Mikrosphärenlagerpuffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 2 bis 8 °C. Die Immobilisierung der Antikörper erfolgte mit sNHS für die Analyten IL-10, IL-2 und IL-17. Für die Analyten IFN-γ und PCT erfolgte die Immobilisierung ohne sNHS.

### 3.2.1.2 Biotinylierung von Antikörpern

Für die Biotinylierung wurde ein NHS-PEG<sub>4</sub>-Biotin Reagenz verwendet. Vor der Biotinylierung der Antikörper wurde ein Pufferaustausch mit Zentrifugalkonzentratoren nach Herstellerangaben unter Verwendung von 120 µg Antikörper durchgeführt. Der Antikörperlagerungspuffer wurde während des Prozesses durch Biotinylierungspuffer ersetzt. Die Konzentration der Antikörperlösung wurde mittels UV/VIS Messung ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 1,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) bestimmt und mit Biotinylierungspuffer auf eine finale Arbeitskonzentration von  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  eingestellt. 100 µL der Antikörperlösung wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 4,5 µL einer  $2,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ -Biotinlösung hinzugegeben (23-fachen molarer Biotinüberschuss) und gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min bei RT. Das nicht gebundene Biotin wurde mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren nach Herstellerprotokoll entfernt. Nach dem Aufreinigungsschritt wurde die Konzentration der Antikörperlösung erneut mittels UV/VIS-Messung ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 1,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) bestimmt und anschließend mit Detektionsantikörperlagerungspuffer auf eine finale Konzentration von  $0,20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 2 bis 8 °C.

### 3.2.2 Simoa-Immunoassay – Durchführung

Die Durchführung aller Simoa-Immunoassays erfolgte mit einem vollautomatisierten Simoa HD1-Analysegerät. Die Immobilisierung der Fängerantikörper auf Mikrosphären und ggf. die Biotinylierung der Detektionsantikörper (finale Antikörperkombinationen siehe Tabelle 15) erfolgte wie beschrieben. Reagenzien wurden in Simoa-Reagenzienflaschen vorgelegt. Zu analysierende Proben wurden in 96-Kavitäten-Platten vorgelegt. Die Mikrosphärenstocklösung wurde in Mikrosphärenpuffer verdünnt und auf eine Mikrosphärenkonzentration von  $2,5\cdot 10^8 \text{ MP}\cdot\text{mL}^{-1}$  eingestellt. Zusätzlich zu den aktiven Mikrosphären wurden Helfer-Mikrosphären mit  $2,5\cdot 10^8 \text{ MP}\cdot\text{mL}^{-1}$  eingesetzt, die gesamt Mikrosphärenzahl betrug demnach  $5,0\cdot 10^8 \text{ MP}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Der Detektionsantikörper wurde in Detektionsantikörperverdünnungspuffer, auf die entsprechend optimierte Arbeitskonzentration (Tabelle 16) verdünnt. Die Streptavidin-β-Galaktosidase (Abk.: SBG) wurde in SBG-Verdünnungspuffer auf die Arbeitskonzentration (Tabelle 16) verdünnt. Das Resorufin β-D-Galaktopyranosid (Abk.: RGP) wurde, wie vom Hersteller bezogen, eingesetzt (keine Konzentrationsangaben vorhanden).

**Tabelle 15: Finale Antikörperpaare der entwickelten Simoa-Immunoassays**

„FA“ = Fängerantikörper, „DA“ = Detektionsantikörper, „MK“ = Monoklonal.

Analyt	Antikörperpaar (Bezeichnung)	FA (Hersteller, Produktnr.)	FA (Spezies, Klonalität)	DA (Hersteller, Produktnr.)	DA (Spezies, Klonalität)
IFN- $\gamma$	FA1 x DA2	R&D Systems, MAB2858	Maus, MK	ThermoFisher Scientific, M701	Maus, MK
IL-2	FA3 x DA1	R&D Systems, MAB620	Maus, MK	BD Pharmingen, 555040	Maus, MK
IL-10	FA1 x DA2	BD Pharmingen, 554705	Ratte, MK	BD Pharmingen, 554499	Ratte, MK
IL-17	FA2 x DA2	Mabtech, MT44.6	Maus, MK	Mabtech, MT504	Maus, MK
PCT	FA1 x DA1	Helmholz Zentrum München, PCT4A6	Ratte, MK	Helmholz Zentrum München, PCT2F3	Ratte, MK

Bei den entwickelten Simoa-Immunoassays handelt es sich um Immunoassays im 2- oder 3-Schrittformat (Tabelle 16). Bei einem 3-Schritt-Assay wurden in einem ersten Schritt 25  $\mu$ L der Mikrosphärenlösung mit 75  $\mu$ L Probe für 30 min inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurden 100  $\mu$ L der Detektionsantikörperlösung hinzugegeben und für 5 min und 15 s inkubiert (2. Schritt). Nach erneuten Waschschrritten wurden 100  $\mu$ L SBG-Lösung hinzugegeben und für 5 min und 15 s inkubiert (3. Schritt). Bei einem 2-Schritt-Assay wurden 25  $\mu$ L Mikrosphärenlösung und 25  $\mu$ L Detektionsantikörperlösung mit 50  $\mu$ L Probe für 35 min und 15 s inkubiert (1. Schritt). Nach mehreren Waschschrritten wurden 100  $\mu$ L SBG-Lösung hinzugegeben und für 5 min und 15 s inkubiert (2. Schritt). Bei beiden Formaten folgten nach der Inkubation mit SBG, Waschschrritte und anschließend die Zugabe von 20  $\mu$ L RGB. Nach Hinzugabe des Enzymsubstrates wurde die Lösung gemischt und 15  $\mu$ L in einen Array einer Simoa-Auslesedisc überführt. Anschließend wurde der Array mit Öl versiegelt und analysiert. Die automatisierte Bildanalyse erfolgt durch die Simoa-Analysesoftware (hier eingesetzte Versionen: 1.3 und 1.5).

**Tabelle 16: Überblick der Simoa-Immunoassays.**

Assayformat/ Reagenzienkonzentration	Simoa-Assay				
	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-10	IL-17	PCT
Assayformat	3-Schritt	2-Schritt	2-Schritt	3-Schritt	3-Schritt
Mikrosphären-Konzentration (MP·mL <sup>-1</sup> )			5,0·10 <sup>8</sup>		
Detektionsantikörperkonzentration ( $\mu$ g·mL <sup>-1</sup> )	0,5	2,0	0,5	1,0	1,0
SBG-Konzentration (pM)	300	150	150	150	150
RGP-Konzentration	nicht bekannt (wie von Hersteller bezogen)				

Für die Bestimmung der Analytkonzentration in Proben mit Simoa-Immunoassays ist der Einsatz von Kalibriergeraden notwendig, wofür rekombinante Proteine eingesetzt werden. Die eingesetzten Kalibriergeraden setzen sich aus sieben Konzentrationsleveln (Tabelle 17) des rekombinanten Proteins und einem Nullwertkalibrator (CAL 8 = Standard- und Probenpuffer) zusammen.

Tabelle 17: Standardkonzentrationen der Kalibriergeraden.

Kalibrierpunkt	Simoa-Assay - Konzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )				
	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-10	IL-17	PCT
CAL 1	100	60,0	13,00	40,0	900
CAL 2	20,0	15,0	3,25	10,0	300
CAL 3	4,00	3,75	0,813	2,50	100
CAL 4	0,800	0,938	0,203	0,630	33,3
CAL 5	0,160	0,234	0,051	0,160	11,1
CAL 6	0,032	0,059	0,013	0,039	3,70
CAL 7	0,006	0,015	0,003	0,010	1,23
CAL 8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Das jeweilige rekombinante Protein wird in Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) seriell auf die benötigten Kalibratorkonzentrationen verdünnt.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Standard- und Probenpuffer.

Simoa-Assay	Zusammensetzung Standard- und Probenpuffer
IFN- $\gamma$	20 % Rinder-EDTA-Plasma (v/v), 0,25 % Tween20 (v/v) in PBS
IL-2	20 % Rinder-EDTA-Plasma (v/v), 0,25 % Tween20 (v/v) in PBS
IL-10	10 % Schweine- EDTA-Plasma (v/v), 0,25 % Tween20 (v/v) in PBS
IL-17	10 % Schweine-EDTA-Plasma (v/v), 0,25 % Tween20 (v/v) in PBS
PCT	4,0 % BSA (w/v), 0,3 % K2 EDTA (w/v), 0,25 % Tween20 (v/v) in PBS

### 3.2.3 Entwicklung von Immunoassays

#### 3.2.3.1 Allgemeines

Die Qualität von Immunoassays ist abhängig von vielen verschiedenen Faktoren. Großen Einfluss haben die eingesetzten Antikörper, Puffer und die Detektionstechnik. Im Rahmen der Entwicklung von Immunoassays werden diese Parameter optimiert, um einen möglichst präzisen, spezifischen und sensitiven Immunoassay zu entwickeln.

#### 3.2.3.2 Identifikation geeigneter Antikörperpaare

Für die Entwicklung der Simoa-Immunoassays wurden kommerziell erhältliche Antikörper (Tabelle 3 und Tabelle 4) und rekombinante Proteine (Tabelle 5) eingesetzt. Die Antikörper wurden kreuzgetestet (jede mögliche Antikörperkombination wurde getestet) und die Ergebnisse aller getesteten Kombinationen basierend auf den Kalibriergeraden evaluiert. Hierbei war das Bewertungskriterium eine möglichst hohe Sensitivität, bewertet durch das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis), dem Hintergrundsignal und dem Kurvenverlauf. Für den Einsatz als Fängerantikörper wurden die Antikörper mit einer Konzentration von 0,50 mg·mL<sup>-1</sup> immobilisiert (siehe Kapitel 3.2.1.1). Detektionsantikörper wurden mit einem 23-fach molaren Biotinüberschuss biotinyliert (siehe Kapitel 3.2.1.2). Für die Herstellung der

Kalibriergeraden der initialen Versuche wurde PBS versetzt mit 2 % BSA (w/v) und 0,25 % Tween20 (v/v) eingesetzt. Die getesteten Konzentrationsbereiche der Simoa-Assays für IFN- $\gamma$  und IL-10 waren 0,0064 bis 100 pg·mL<sup>-1</sup>, der des IL-2 Simoa-Assays war 0,122 bis 50,0 pg·mL<sup>-1</sup>. Für IL-17 wurde ein Konzentrationsbereich von 0,016 bis 250 pg·mL<sup>-1</sup> und für PCT von 0,23 bis 500 pg·mL<sup>-1</sup> getestet. Die Kalibriergeraden bestanden aus sieben Kalibratorpunkten und einer Leerwertbestimmung (Hintergrundsignal). Die Detektion erfolgte mit 0,50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> Detektionsantikörperantikörper und 150 pM SBG. Alle Versuche wurden im 2-Schrittassayformat durchgeführt.

#### 3.2.3.3 Ermittlung eines geeigneten Assayprotokolls

Ein wichtiger Parameter für die Optimierung von Simoa-Immunoassays ist die Wahl des Assayprotokolls. In dieser Arbeit wurden 2-Schritt- und 3-Schrittassayformate getestet und verglichen. Die Durchführung der Protokolle erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 dieser Arbeit beschrieben. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Kalibriergeraden und der höchsten erreichten Sensitivität.

#### 3.2.3.4 Optimierung der Pufferzusammensetzung

Bei der Entwicklung von Immunoassays ist die Reduktion von unspezifischen Bindungen, Kreuzreaktivitäten und Matrixeffekten essenziell. Um die verwendeten Assaypuffer der Simoa-Assays an die Zielmatrix anzugleichen wurde PBS als Basis mit Proteinen, wie BSA oder Tierplasma versetzt. Als Standard- und Probenpuffer wurden folgende Puffer getestet: PBS versetzt mit 0,25 % Tween20 (v/v) und 5 bzw. 10 % Schweine-EDTA-Plasma (K2), 10 bzw. 20 % Rinder-EDTA-Plasma (K2), 10 % Schafs-EDTA-Plasma (K2) oder 2 bzw. 4 % BSA. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Kalibriergeraden und der Analyse von humanen Plasmaproben.

#### 3.2.3.5 Optimierung der Konzentrationen der Reagenzien

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Optimierung von Simoa-Immunoassays sind die Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien. In dieser Arbeit wurden die jeweilige Detektionsantikörper- und die Streptavidin- $\beta$ -galaktosidaskonzentration optimiert. Hierfür wurden die Konzentrationen beider Reagenzien variiert und gegeneinander getestet. Als Standardkonzentrationen wurden eine 0,50  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> konzentrierte Detektionsantikörperlösung und eine 150 pM konzentrierte SBG-Lösung verwendet.

Getestet wurden Detektionsantikörperkonzentrationen zwischen 0,25 und 2,0  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> und SBG-Konzentrationen zwischen 30 und 300 pM. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Kalibriergeraden und der höchsten erreichten Sensitivität.

### 3.2.4 Validierung der entwickelten Simoa-Immunoassays

#### 3.2.4.1 Validierungsrichtlinien und Parameter

Die Validierung der Simoa-Immunoassays erfolgten in einem zweckgerichteten Ansatz (engl.: fit-for-purpose approach) [27, 28] unter Berücksichtigung von Richtlinien der Europäischen Arzneimittel-Agentur (Abk.: EMA) und der US-amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (Abk.: FDA) [23, 24], insofern diese Richtlinien auf Liganden-Bindungsassays übertragbar waren.

Während der Validierung wurden folgende Immunoassay-Parameter bestimmt: Kalibrierkurvenmodell, Bestimmungsgrenzen (obere- und untere Bestimmungsgrenze), Nachweisgrenze, Präzision (Intraassay- und Interassay-Präzision), Wiederfindungsrate, Verdünnungslinearität, Parallelität und Analytstabilität (Kurzzeitstabilität und die Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen).

#### 3.2.4.2 Generierung von Qualitätskontrollproben

Für die Generierung von Qualitätskontrollproben (Abk.: QC-Proben) wurde die endogene Analytkonzentration mit den entwickelten Simoa-Immunoassays, in zwei humanen EDTA-Plasmaproben bestimmt. Nach Bestimmung der endogenen Analytkonzentration wurden die Proben, durch das Verdünnen in Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) oder durch das Versetzen mit rekombinantem Protein (Tabelle 5) auf die gewünschte Analytkonzentration eingestellt. War die endogene Analytkonzentration im vorgesehenen Bereich, konnten die Proben ohne Vorbehandlung als QC-Proben eingesetzt werden (Konzentration des rekombinanten Proteins =  $0,00 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  und Verdünnungsfaktor zur Herstellung der QC-Probe = 0). Die eingestellten Konzentrationen der QC-Proben wurden entsprechend dem Messbereich des Simoa-Immunoassays gewählt umso den oberen, mittleren und unteren Bereich der Kalibrierkurve abzudecken (Tabelle 19). Nach Herstellung der QC-Proben wurden diese für den einmal Gebrauch aliquotiert und bei  $< -60 \text{ }^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Vor Analyse der hergestellten QC-Proben wurden diese in Standard- und Probenpuffer verdünnt (Verdünnungsfaktor siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19: Herstellung der Qualitätskontrollproben.**

„NV“ = Nicht vorhanden (es war keine Probe im entsprechenden Konzentrationsbereich vorgesehen).

Simoa-Assay	Herstellung	Qualitätskontrollproben				
		QC 1	QC 2	QC 3	QC 4	QC 5
<b>IFN-γ</b>	Human K2 EDTA-Plasma	1	1	2	2	1
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	40,0	2,00	0,00	0,00	0,00
	Verdünnungsfaktor (Herstellung)	0	0	0	2	1,5
	Verdünnungsfaktor (Analyse)			1,5		
<b>IL-2</b>	Human K2 EDTA-Plasma	2	2	2	2	2
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	40,0	6,00	2,00	0,25	0,00
	Verdünnungsfaktor (Herstellung)	0	0	0	0	0
	Verdünnungsfaktor (Analyse)			2		
<b>IL-10</b>	Human K2 EDTA-Plasma	1	1	1	1	
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	400	0,00	0,00	0,00	NV
	Verdünnungsfaktor (Herstellung)	0	0	5	10	
	Verdünnungsfaktor (Analyse)		4			
<b>IL-17</b>	Human K2 EDTA-Plasma	2	2	2	2	
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	80,0	8,00	2,40	0,40	NV
	Verdünnungsfaktor (Herstellung)	0	0	0	0	
	Verdünnungsfaktor (Analyse)		3			
<b>PCT</b>	Human K2 EDTA-Plasma	2	2	2	2	2
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	300	90,0	10,0	0,00	0,00
	Verdünnungsfaktor (Herstellung)	0	0	0	0	3
	Verdünnungsfaktor (Analyse)			7,5		

### 3.2.4.3 Validierung des Kalibrierkurvenmodells

Die Validierung des Kalibrierkurvenmodells erfolgte durch die Durchführung von fünf bis acht unabhängigen Experimenten, in denen die Kalibrierkurve (Tabelle 17) in Duplikaten analysiert wurde. Es wurden für alle Messpunkte der Kalibrierkurve die Wiederfindungsrate und die Präzision, anhand des Variationskoeffizienten (Abk.: VK) in %, der rückgerechneten Konzentrationsmittelwerte über alle durchgeführten Analysen ermittelt. Die festgelegten Akzeptanzkriterien waren eine Wiederfindungsrate (Abk.: WFR) von 80 bis 120 % (bezogen auf die eingesetzte Konzentration) und eine Präzision von kleiner als 20 % VK.

Um die Richtigkeit der finalen Kalibrierkurven zu untersuchen, wurde, wenn vorhanden, eine Kalibrierung des Standardproteins mit WHO-Referenzmaterial durchgeführt. Für die Analyten IL-2, IL-10 und IL-17 wurde WHO-Referenzmaterial bezogen. Für die Analyten IFN-γ und PCT war kein Referenzmaterial verfügbar und eine Kalibrierung durch anerkanntes Referenzmaterial konnte nicht durchgeführt werden. Das WHO-Referenzmaterial wurde auf die Konzentrationen der jeweiligen Standardkalibratoren (CAL 1 bis CAL 7) mit Standard- und Probenpuffer verdünnt und in Triplikaten analysiert. Die erhaltenen Signalwerte für die WHO-Standardkalibratoren wurden für die Berechnung der Konzentrationswerte mit der jeweiligen Kalibrierkurve zurückgerechnet. Der Korrekturfaktor wurde als Verhältnis von nominaler und

gemessener Konzentration, gemittelt über sechs rückgerechnete Konzentrationen (WHO 1 - WHO 6), bestimmt.

#### 3.2.4.4 Ermittlung der Bestimmungsgrenzen

Für die Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze wurde ausgehend von CAL 4 (Tabelle 17) eine Verdünnungsreihe erstellt. Hierfür wurde CAL 4 für sieben- bis achtmal mit einem Verdünnungsfaktor von zwei in Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde anschließend in drei unabhängigen Experimenten an drei unabhängigen Tagen analysiert und jede Verdünnung in Triplikaten analysiert. Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden die Wiederfindungsrate, bezogen auf CAL 4, und die Präzision (VK%) der rückgerechneten Konzentrationsmittelwerte über die durchgeführten Analysen ermittelt. Die festgelegten Akzeptanzkriterien waren eine Wiederfindungsrate von 75 bis 125 % und eine Präzision von kleiner als 25 % VK. Als untere Bestimmungsgrenze wurde die niedrigste Konzentration definiert, bei welcher beide Akzeptanzkriterien erfüllt wurden.

Die Bestimmung der oberen Bestimmungsgrenze (engl.: Upper Limit of Quantification, Abk.: ULoQ) erfolgte aus den generierten Ergebnissen der Kalibrierkurven aus fünf bis acht unabhängigen Experimenten, in denen die Kalibrierkurven in Duplikaten analysiert wurde. Es wurden die Wiederfindungsrate, bezogen auf die eingesetzte Konzentration, und die Präzision (VK %) der rückgerechneten Konzentrationsmittelwerte über alle durchgeführten Analysen ermittelt. Die festgelegten Akzeptanzkriterien waren eine Wiederfindungsrate von 75 bis 125 % und eine Präzision von kleiner als 25 % VK. Als obere Bestimmungsgrenze wurde die höchste Kalibratorkonzentration definiert, bei welcher beide Akzeptanzkriterien erfüllt wurden.

#### 3.2.4.5 Ermittlung der Nachweisgrenze

Für die Ermittlung der Nachweisgrenze (engl.: Limit of Detection, Abk.: LoD) wurden in einem Validierungslauf 20 bis 24 Replikate des Nullwert-Kalibrators (Standard- und Probenpuffer) gemessen, und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der AEB-Werte (Hintergrundsignal) berechnet. Mit Hilfe der AEB-Werte, der Konzentrationen der Standardkalibratoren CAL 6 und CAL 7 und dem bestimmten Hintergrundsignal (Analytkonzentration =  $0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) wurde eine lineare Regressionsgerade erstellt. Mit der erhaltenen Regressionsgeradengleichung wurde die Konzentration des Hintergrundsignals + 3-Standardabweichung ermittelt. Die erhaltene Konzentration wurde als Nachweisgrenze definiert. Für die Definition der Nachweisgrenze wurden keine Akzeptanzkriterien definiert.

#### 3.2.4.6 Bestimmung der Präzision

Die Intraassay- und Interassay-Präzision wurden im hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich der Simoa-Immunoassays bestimmt. Für die Bestimmung wurden die

Qualitätskontrollproben (Herstellung siehe Tabelle 19) verwendet. Die QC-Proben wurden in Standard- und Probenpuffer verdünnt (Verdünnungsfaktor siehe Tabelle 19) und anschließend analysiert. Die für die Bestimmung der Intraassay- und Interassay Präzision verwendeten QC-Proben sind in Tabelle 20 gelistet.

Die Intraassay-Präzision wurde mit drei QC-Proben durch Analyse von 12 Replikaten pro Validierungsprobe in einem Validierungslauf bestimmt. Über die rückgerechneten Konzentrationsmittelwerte der 12 Replikate wurde die Präzision (VK %) ermittelt. Die festgelegten Akzeptanzkriterien waren ein VK % von kleiner als 15 % im mittleren Konzentrationsbereich und kleiner als 20 % im niedrigen und hohen Konzentrationsbereich. Die Interassay-Präzision wurde anhand von vier bis fünf QC-Proben in vier bis sieben unabhängigen Analyseläufen, jeweils in Triplikaten, bestimmt. Über die rückgerechneten Konzentrationsmittelwerte der Analyseläufe (Mittelwert der Triplikate) wurde der VK % ermittelt. Die festgelegten Akzeptanzkriterien waren ein VK von kleiner als 20 % bzw. kleiner 30 % um den LLoQ bzw. ULoQ.

**Tabelle 20: Eingesetzte QC-Proben für die Bestimmung der Intraassay- und Interassay-Präzision.**

„X“ = Verwendete QC-Probe zur Bestimmung der Intraassay- bzw. Interassay-Präzision, „/“ = Nicht verwendete QC-Probe zur Bestimmung der Intraassay- bzw. Interassay-Präzision, „NV“ = Nicht vorhanden (es war keine Probe im entsprechenden Konzentrationsbereich vorgesehen).

Simoa-Assay Verwendung		Qualitätskontrollproben				
		QC 1	QC 2	QC 3	QC 4	QC 5
IFN- $\gamma$	Intraassay-Präzision	X	X	/	X	/
	Interassay-Präzision	X	X	X	X	X
IL-2	Intraassay-Präzision	/	X	/	X	X
	Interassay-Präzision	X	X	X	X	X
IL-10	Intraassay-Präzision	X	X	X	/	NV
	Interassay-Präzision	X	X	X	X	NV
IL-17	Intraassay-Präzision	X	/	X	X	NV
	Interassay-Präzision	X	X	X	X	NV
PCT	Intraassay-Präzision	X	/	X	/	X
	Interassay-Präzision	X	X	X	X	X

#### 3.2.4.7 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte im hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich der Simoa-Immunoassays. Hierfür wurde humanes EDTA-Plasma, mit niedriger endogener Analytkonzentration, mit unterschiedlichen Mengen an rekombinantem Protein versetzt (Tabelle 21). War kein humanes Plasma mit niedrigem Analytlevel vorhanden, wurde tierisches EDTA-Plasma als Ersatzmatrix, für die Herstellung der Proben, verwendet. Die Proben wurden in Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) verdünnt und in Triplikaten in einem Validierungslauf analysiert.

**Tabelle 21: Herstellung der Proben zur Bestimmung der Wiederfindungsrate.**

„NV“ = Nicht vorhanden (Probe war nicht vorgesehen).

Simoa-Assay Herstellung		Wiederfindungsrate				
		WR 1	WR 2	WR 3	Ref. 1	Ref. 2
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Spezies (K2 EDTA-Plasma)	Human	Human	Ratte	Human	Ratte
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	30,0	3,00	0,30	0,00	0,00
	Verdünnungsfaktor (Analyse)	2	2	2	2	2
<b>IL-2</b>	Spezies K2 EDTA-Plasma	Human	Human	Human	Human	
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	40,0	2,80	0,28	0,00	NV
	Verdünnungsfaktor (Analyse)	4	4	4	4	
<b>IL-10</b>	Spezies (K2 EDTA-Plasma)	Human	Human	Human	Human	
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	24,0	2,00	0,16	0,00	NV
	Verdünnungsfaktor (Analyse)	8	8	8	8	
<b>IL-17</b>	Spezies (K2 EDTA-Plasma)	Human	Human	Schwein	Human	Schwein
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	40,0	2,00	0,16	0,00	0,00
	Verdünnungsfaktor (Analyse)	4	4	4	4	4
<b>PCT</b>	Spezies (K2 EDTA-Plasma)	Human	Human	Human	Human	
	Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	300	30,0	6,00	0,00	NV
	Verdünnungsfaktor (Analyse)	10	10	10	10	

Für die Auswertung wurde die Wiederfindungsrate der rückgerechneten Konzentrationsmittelwerte, bezogen auf die eingesetzte Konzentration, nach Abzug des endogenen Analytlevels des verwendeten EDTA-Plasmas (Referenzprobe, Abk.: Ref.), bestimmt. Die Gleichung für die Berechnung der Wiederfindungsrate in % (Abk.: %WFR) ist im Folgenden dargestellt:

$$\%WFR = \frac{(\text{gemessene Konz.}_{\text{gespikte Probe}} - \text{gemessene Konz.}_{\text{Referenzprobe}})}{\text{Thoretische nominale Konz.}} \cdot 100 \quad (5)$$

Das festgelegte Akzeptanzkriterium war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 %, bezogen auf die eingesetzte Konzentration des rekombinanten Proteins.

#### 3.2.4.8 Bestimmung der Verdünnungslinearität

Für die Bestimmung der Verdünnungslinearität wurde humanes EDTA-Plasma mit rekombinatem Protein (Tabelle 5) auf eine Konzentration im Bereich der höchsten Kalibratorkonzentration versetzt. Die hergestellten Proben wurden dann zunächst initial und anschließend seriell mit einem Verdünnungsfaktor von 2, 2,5 oder 3 über den gesamten Assaybereich mit Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) verdünnt (Tabelle 22). Die Analyse der erstellten Proben erfolgte in Triplikaten in einem Lauf. Die rückgerechneten Konzentrationsmittelwerte der Replikate wurden gemittelt und der erhaltene Konzentrationswert als 100 %-Wert für die Bestimmung der Wiederfindungsrate eingesetzt. Das festgelegte Akzeptanzkriterium war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 %, bezogen auf den ermittelten 100 %-Wert.

**Tabelle 22: Herstellung der Proben zur Bestimmung der Verdünnungslinearität.**

Verdünnungslinearität - Validierungsproben	Simoa-Assay				
	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-10	IL-17	PCT
Konz. rekomb. Protein (pg·mL <sup>-1</sup> )	150	100	80,0	40,0	5000
Eingesetzte Verdünnungsfaktoren zur Bestimmung der Verdünnungslinearität	5	4	8	2	8
	50	12	50	6	20
	100	36	100	18	50
	200	108	200	54	125
	400	324	400	162	313
	800	972	800	486	781
	1600	2916	1600	1458	1953
	3200	8747	3200	–	4883

#### 3.2.4.9 Bestimmung der Parallelität

Für die Bestimmung der Parallelität wurde humanes EDTA-Plasma mit hohem endogenem Analytlevel mit Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) seriell verdünnt. War kein humanes EDTA-Plasma mit hohem endogenem Analytlevel vorhanden, konnte die Parallelität nicht bestimmt werden. Die humanen EDTA-Plasma-Proben wurden zunächst initial 1:2 bzw. 1:4 und anschließend seriell mit dem Faktor zwei (Tabelle 23) über den dynamischen Assaybereich, verdünnt. Die Analyse der erstellten Proben erfolgte in Triplikaten in einem Lauf. Die rückgerechneten Konzentrationsmittelwerte der Replikate wurden gemittelt und der erhaltene Konzentrationswert, für die Bestimmung der Wiederfindungsrate, als 100 %-Wert eingesetzt. Das festgelegte Akzeptanzkriterium war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 %, bezogen auf den ermittelten 100 %-Wert.

**Tabelle 23: Verdünnungsfaktoren zur Bestimmung der Parallelität**

Parallelität - Validierungsproben	Simoa-Assay			
	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-17	PCT
Eingesetzte Verdünnungsfaktoren zur Bestimmung der Parallelität	2	4	2	4
	4	8	4	8
	8	16	8	16
	16	32	-	32
	-	64	-	64
	-	128	-	-
	-	-	-	-

#### 3.2.4.10 Bestimmung der Analytstabilität

Die Analytstabilität wurde bezüglich der Zeit und Temperatur der Lagerung sowie bezüglich der Stabilität beim Einfrieren und Auftauen von Proben ermittelt. Hierfür wurden zehn Aliquote einer EDTA-Plasma-Probe mit einer Analytkonzentration im mittleren Konzentrationsbereich hergestellt und bei < -60 °C tiefgefroren.

Für die Untersuchung der Kurzzeitstabilität wurde jeweils eines der hergestellten Aliquote vor der Analyse bei RT und eines bei 2 bis 8 °C für jeweils 2, 4 oder 24 h gelagert (insgesamt 6 Aliquote), anschließend in Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) verdünnt und jeweils in

Triplikaten analysiert. Für die Untersuchung der Analytstabilität nach Einfrier- und Auftauzyklen wurden drei Aliquote bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend gemischt und erneut bei  $< -60\text{ °C}$  für mindestens 12 h eingefroren (1. Zyklus). Für den zweiten Einfrier- und Auftauzyklus wurden zwei der vorherigen drei Aliquote erneut bei RT aufgetaut, gemischt und wieder für mindestens 12 h bei  $< -60\text{ °C}$  tiefgefroren. Für den dritten Einfrier- und Auftauzyklus wurde eines der Aliquote mit zwei Einfrier- und Auftauzyklen erneut bei RT aufgetaut, gemischt und wieder bei  $< -60\text{ °C}$  tiefgefroren. Die drei erhalten Aliquote wurden anschließend in Standard- und Probenpuffer verdünnt und jeweils in Triplikaten analysiert. Als Referenzprobe für die jeweiligen Analytstabilitätsproben diente das zuvor erstellte 10. Aliquot, welches direkt vor der Analyse bei RT aufgetaut und in Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) verdünnt wurde. Für die Bestimmung der Analytstabilität wurde die Wiederfindungsrate der rückgerechneten Konzentrationsmittelwerte jeder Probe, bezogen auf die rückgerechnete Konzentration der Referenzprobe, bestimmt. Das festgelegte Akzeptanzkriterium war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 %.

### 3.2.5 Probengenerierung und Analyse

#### 3.2.5.1 Blutproben gesunder Spender

Für die Bestimmung der Analytkonzentrationen in EDTA-Plasma und Serum gesunder Spender wurde EDTA-Plasma (K2) und Serum kommerziell von Seralab Laboratories International LTD (West Sussex, Vereinigtes Königreich) bezogen. Es wurde EDTA-Plasma und Serum von Frauen und Männern unterschiedlichen Alters (Tabelle 24) analysiert.

**Tabelle 24: Spenderdaten zur Bestimmung der Analytlevel in gesunden Spendern.**

„IQA“ = Interquartilsabstand

Spenderdaten	Matrix	
	Serum	Plasma
Anzahl Spender (n)	44	49
Mittelwert Alter (Jahre)	37,8	33,7
Median Alter (Jahre)	32,0	31,0
IQA Alter (Jahre)	21,0	17,0
Geschlecht (männl. / weibl.)	20 / 24	24 / 25

Die Gewinnung der bezogenen EDTA-Plasma- und Serumproben erfolgte aus Vollblutspenden (durchgeführt durch Vertreiber). Nach Erhalt der Proben wurden diese bei 2 bis 8 °C aufgetaut, für den Einmalgebrauch aliquotiert und bei  $< -60\text{ °C}$  tiefgefroren. Für die Analyse der EDTA-Plasma- und Serumproben wurden diese initial in den für die jeweiligen Simoa-Immunoassays optimierten Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) verdünnt. Bedingt durch das jeweils zugrundeliegende Assayformat erfolgte eine weitere Verdünnung der Proben mit Mikrosphärenlösung (3-Schrittformat) bzw. mit Mikrosphären- und Detektionsantikörperlösung (2-Schrittformat). Bei den entwickelten 2-Schritt-Immunoassays

erfolgte eine zusätzliche Verdünnung um den Faktor 2, bei den entwickelten 3-Schritt-Immunoassays eine zusätzliche Verdünnung um den Faktor 1,33 (Tabelle 16). Für die Bestimmung der IFN- $\gamma$  Konzentration wurden die Proben mit dem Faktor 1,5 (finale Verdünnung im Assay: 2) verdünnt, für IL-2 mit dem Faktor 2 (finale Verdünnung im Assay: 4), für IL-10 mit dem Faktor 4 (finale Verdünnung im Assay: 8), für IL-17 mit dem Faktor 3 (finale Verdünnung im Assay: 4) und für PCT mit dem Faktor 4,5 (finale Verdünnung im Assay: 6). Die Analyse der Proben erfolgte in Duplikaten.

### 3.2.5.2 Blut- und Zerebrospinalflüssigkeitsproben von Patienten mit diagnostizierter und nicht diagnostizierter Meningitis

Serum- und Zerebrospinalflüssigkeitsproben von jeweils 15 Patienten mit diagnostizierter Meningitis, viraler (Abk.: VM) und bakterieller (Abk.: BM), sowie Serum- und Zerebrospinalflüssigkeitsproben von Patienten ohne diagnostizierter Meningitis (n = 15, Kontrolle) wurden für die Analyse mit dem PCT Simoa-Immunoassay von dem Universitätsklinikum Ulm (Klinik für Neurologie), durch eine Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Markus Otto, zur Verfügung gestellt. Detailliertere Informationen zu den Patienten mit klinischen Befunden sind im Folgenden zusammengefasst (Tabelle 25). Für die Analyse der Proben mit dem PCT Simoa-Assay wurden diese initial mit dem Faktor 7,5 in Standard- und Probenpuffer (Tabelle 18) verdünnt. Dies entsprach einem finalen Verdünnungsfaktor von 10. Die Analyse der Proben erfolgte in Duplikaten.

**Tabelle 25: Patientendaten mit diagnostizierter und nicht diagnostizierter Meningitis.**

„NB“ = Nicht Bestimmt.

Patientendaten		Diagnose		
		BM	VM	Kontrolle
Anzahl Patienten (n)		15	15	15
Geschlecht (männl. / weibl.)		8 / 7	7 / 8	6 / 9
Proben der Patienten (CSF / Serum)		15 / 15	15 / 15	15 / 15
Alter (Jahre)	Mittelwert	46,5	50,3	50,6
	Median	55,0	45,0	49,0
	IQA	33,0	37,0	38,0
Zellzahl in CSF (n)	Mittelwert	351	93,7	1,13
	Median	128	40,0	1,00
	IQA	343	77,0	2,00
Laktatkonz. in CSF (mmol·L <sup>-1</sup> )	Mittelwert	5,06	1,94	1,69
	Median	3,20	1,90	1,60
	IQA	2,20	0,600	0,600
Albumin-Quotient (x·10 <sup>-3</sup> )	Mittelwert	33,3	8,66	4,95
	Median	12,1	6,00	4,80
	IQA	33,1	6,80	1,60
C-Reaktives Proteinkonz. in Serum (mg·L <sup>-1</sup> )	Mittelwert	64,6	9,73	NB
	Median	22,6	2,10	NB
	IQA	72,2	5,42	NB

### 3.2.5.3 Blutproben ausdauertrainierter Probanden

Für die mögliche Charakterisierung neuer Biomarker und Indikatoren des Trainings- und Belastungsprozesses bei Sportlern wurden Plasmaproben von 21 gesunden männlichen ausdauertrainierten Probanden vor und nach einer Akutbelastung mit den entwickelten Simoa-Assays analysiert. Die Proben (Tabelle 26) wurden von dem Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Sportmedizin, durch eine Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Andreas Nieß, zur Verfügung gestellt. Bei den 21 Probanden handelte es sich um ausdauertrainierte Probanden, welche nach folgenden Einschlusskriterien ausgewählt wurden: > 5 h Ausdauersport/Woche; < 1 h Kraftsport/Woche; relative maximale Sauerstoffaufnahme:  $VO_{2max} > 57 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ , Alter 18 bis 30 Jahre.

**Tabelle 26: Probandendaten zur Bestimmung der Analytlevel in Blutproben ausdauertrainierter Probanden.**

<b>Probandendaten</b>		<b>Ausdauerportler</b>
Anzahl Probanden (n)		21
Alter (Jahre)	Mittelwert	24,8
	Median	25,0
	IQA	3,00
BMI ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ )	Mittelwert	20,8
	Median	20,5
	IQA	0,900
Laufgeschwindigkeit an IAS ( $\text{km} \cdot \text{h}^{-1}$ )	Mittelwert	16,8
	Median	16,2
	IQA	0,800
Herzfrequenz an IAS ( $\text{min}^{-1}$ )	Mittelwert	171
	Median	171
	IQA	12,0
$VO_{2max}$ ( $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ )	Mittelwert	4,64
	Median	4,53
	IQA	0,599

Die Probenentnahme, der in dieser Arbeit analysierten Proben, erfolgte vor der Einlaufphase (in Ruhe), 30 Minuten nach dem Tempodauerlauf und zwei Stunden nach dem Tempodauerlauf. Der Tempodauerlauf erfolgte auf einem Laufband bei einer Belastung von 105 % der individuellen anaeroben Schwelle (Abk.: IAS) für 30 Minuten.

Nach Erhalt der tiefgefrorenen Proben vom Universitätsklinikum Tübingen wurden diese bei 2 bis 8 °C aufgetaut, für den Einmalgebrauch aliquotiert und bei < -60 °C tiefgefroren.

Die initialen Verdünnungsfaktoren waren 1,5 (IFN- $\gamma$ ), 2 (IL-2), 4 (IL-10), 3 (IL-17) und 3 (PCT). Wie schon in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben, erfolgte bedingt durch das jeweils zugrundeliegende Assayprotokoll eine weitere Verdünnung der Proben. Die Analyse der Proben erfolgte in Duplikaten.

## 3.2.6 Datenanalyse

### 3.2.6.1 Simoa Datenanalyse

Die Durchführung aller Simoa-Immunoassays erfolgte mit einem vollautomatisierten Simoa HD1-Analysegerät (Quanterix), welches mit der HD-1 Analysesoftware Version 1.3 bzw. 1.5

(Quanterix) betrieben worden ist. Durch die Bildanalyse eines Arrays generierte die HD-1 Analysesoftware ein Messsignal. Bei diesem Messsignal handelt es sich um den „Average Enzyme per Bead“-Wert (Abk. AEB), d. h. um den Mittelwert der von einer Mikrosphäre getragenen Enzyme. Für die Generierung eines validen Messwertes war die Erfassung des Signales von mindestens 1000 Mikrosphären erforderlich (Normalwert ca. 10000 Mikrosphären). Die erhaltenen AEB-Werte wurden anschließend ebenfalls mit der HD-1 Analysesoftware zur Erstellung der Kalibrierkurven und für die Quantifizierung der Konzentration der Analyten in den Proben eingesetzt. Das Kalibrierkurvenmodell der Kalibriergeraden war ein 4-parametrisch logistischer Fit (Gewichtung:  $1/Y^2$ ). Mit der erstellten Kalibrierkurve und den AEB-Werten der Proben wurde die Analytkonzentration bestimmt. Die für die Erstellung einer Kalibriergeraden verwendeten Funktion ist im Folgenden dargestellt:

$$Signal = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \quad (6)$$

Dabei ist  $x$  die Konzentration.

### 3.2.6.2 Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk

Der Test nach Shapiro-Wilk ist ein statistischer Vergleichstest für die Prüfung auf Normalverteilung der Grundgesamtheit einer Stichprobe [114]. Dieser Vergleichstest hat eine hohe Teststärke bei kleinen Stichproben. Im Zuge eines Testes auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk wird die Varianz auf zwei unterschiedliche Arten geschätzt: Regression im Quantil-Quantil-Diagramm und Stichprobenvarianz. Liegt eine Normalverteilung vor, nimmt der Quotient der beiden bestimmten Varianzen einen Wert von ca. eins ein. Für die Berechnung der Testgröße ( $W$ ) werden die Stichproben der Größe nach aufsteigend sortiert und anschließend mit folgender Gleichung berechnet:

$$W = \frac{b^2}{S^2} = \frac{(\sum_{i=1}^k a_{n-i+1} (y_{n-i+1} - y_i))^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (7)$$

Dabei ist  $n$  die Anzahl der Stichproben,  $y_n$  die Bezeichnung der sortierten Messwerte,  $x_i$  die Messwerte. Ist  $n$  eine gerade Zahl gilt  $k = \frac{n}{2}$ . Ist  $n$  eine ungerade Zahl gilt  $k = \frac{n-1}{2}$ . Die Werte für  $a_{n-i+1}$  sind tabellierte Koeffizienten und hängen von der Stichprobengröße ab (Tabelle 5 von [114]). Ist die berechnete Testgröße ( $W$ ) kleiner als die von der Stichprobenzahl und von dem gewählten Signifikanzniveau abhängige kritische Grenze (gelistet in Tabelle 6 von [114]) liegt keine Normalverteilung vor. Die Durchführung eines Testes auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk erfolgte mit der Software OriginPro 2015G.

### 3.2.6.3 Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

Für die Bestimmung eines Zusammenhangs zweier Variablen, wie z. B. Ergebnisse zweier Methoden, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ermittelt [115]. Hierfür wurden Proben mit einem entwickelten Simoa-Immunoassay und der Vergleichsmethode (z. B. klinisches Analysegerät) analysiert und die rückgerechneten Konzentrationswerte der Methoden verglichen.

Die Rangkorrelation nach Spearman ist eine nichtparametrische Korrelationsanalyse, welche den bivariaten Zusammenhang zweier Variablen beschreibt. Diese Korrelationsanalyse bedingt keine Normalverteilung und/oder keinen linearen Zusammenhang der Daten, die Variablen müssen jedoch ordinalskaliert sein und dem Zusammenhang einer monotonen Funktion folgen. Für die Bestimmung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ) wird nicht mit den Messdaten, sondern mit Rängen, welche die Messdaten ersetzen, gerechnet. Die Messwerte der beiden Variablen werden zunächst in aufsteigender Reihenfolge sortiert und mit ebenfalls aufsteigenden Rangzahlen, eine Rangreihe gebildet. Treten keine Bindungen, d. h. keine identischen Werte mehrfach auf, kann der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman mit folgender vereinfachter Gleichung berechnet werden:

$$r_s = 1 - \frac{6 \cdot \sum_{i=1}^n d_i^2}{n \cdot (n^2 - 1)} \quad (8)$$

Dabei ist  $n$  die Anzahl an Wertepaaren und  $d_i$  die Differenz der Rangzahlen.

Treten Bindungen auf muss der arithmetische Mittelwert der entsprechenden Rangzahlen für die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman verwendet werden [115]. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman kann Werte zwischen -1 und +1 einnehmen. Ist  $r_s$  größer Null handelt es sich um einen positiven Zusammenhang, ist  $r_s$  kleiner Null um einen negativen Zusammenhang. Je weiter sich der  $r_s$ -Wert der Null annähert, desto schwächer ist der Zusammenhang der beiden Variablen. Ein starker Zusammenhang zwischen Variablen liegt dann vor, wenn der  $r_s$ -Wert nahe  $\pm 1$  liegt. Ein schwacher Zusammenhang liegt vor, wenn der  $r_s$ -Wert nahe Null liegt [116]. Der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman wurde mit Hilfe der Software OriginPro 2015G berechnet.

### 3.2.6.4 Passing-Bablok Regression

Die Passing-Bablok Regression ist eine nicht-parametrische Methode zur geschätzten Bestimmung der Steigung ( $a$ ) und des y-Achsenabschnitts ( $b$ ), einer linearen Regressionsgleichung ( $y = a \cdot x + b$ ) zur Überprüfung der Gleichheit von Messwerten zweier zu vergleichender analytischer Methoden [117, 118]. Für die Bewertung der Übereinstimmung

zweier Messreihen, bestimmt durch zwei unterschiedliche Messmethoden, wurde eine Passing-Bablok-Regression durchgeführt. Hierfür wurden Proben mit einem entwickelten Simoa-Immunoassay und der Vergleichsmethode (z. B. klinisches Analysegerät) analysiert und die rückgerechneten Konzentrationswerte der Methoden verglichen. Voraussetzung für die Verwendung der Passing-Bablok Regression ist ein stark positiv linearer Zusammenhang zwischen den beiden Messreihen. Für jedes Wertepaar wird die Steigung der durch diese Punkte gelegten Geradengleichung bestimmt. Die Steigung der Passing-Bablok Regressionsgeraden stellt den Median aller berechneten Steigungen dar. Mit der Steigung der Passing-Bablok-Geradengleichung und den x- und y- Werten jedes Punktes wird für jeden Punkt ein y-Achsenabschnitt berechnet ( $b = y_i - a \cdot x_i$ ). Der y-Achsenabschnitt der Passing-Bablok Regressionsgeraden ist der Median aller berechneten y-Achsenabschnitte. Die Bestimmung der Passing-Bablok Regression erfolgte mit der Software Excel (Excel-Tool Passing-Bablok-Regression, Acomed Statistik).

### 3.2.6.5 Statistischer Signifikanztest nach Mann, Whitney und Wilcoxon (U-Test)

Der U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon ist ein Signifikanztest mit welchem zwei voneinander unabhängige und verteilungsfreie Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz verglichen werden können [119, 120]. Um Unterschiede zwischen beispielsweise gesunden und erkrankten Patienten zu identifizieren, wurde ein U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon durchgeführt. Hierbei wird untersucht, ob die Verteilungen und die Mittelwerte der zwei zu vergleichenden Stichproben gleich sind. Der U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon bedingt keine Normalverteilung der Daten, jedoch eine gleiche bis ähnliche Verteilungsform und unabhängige Stichproben. Mit dem U-Test wird folgende Nullhypothese geprüft: Gleiche Wahrscheinlichkeit einer Beobachtung (aus beiden Grundgesamtheiten) für beide Grundgesamtheiten. Für die Berechnung der Prüfgröße ( $U$ ) werden die Messwerte der beiden Stichproben zunächst in aufsteigender Reihenfolge sortiert und mit ebenfalls aufsteigenden Rangzahlen, eine Rangreihe gebildet. Anschließend werden die Rangsummen der beiden Stichproben ( $R_1, R_2$ ) bestimmt und die Prüfgröße wie folgt berechnet:

$$\text{Stichprobe 1: } U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1(n_1+1)}{2} - R_1 \quad (9)$$

$$\text{Stichprobe 2: } U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2(n_2+1)}{2} - R_2 \quad (10)$$

$$\text{Prüfgröße: } U = \text{Min}(U_1, U_2) \quad (11)$$

Dabei sind  $n_1$  und  $n_2$  die Stichprobenumfänge und  $R_1$  und  $R_2$  die Rangsummen der Stichproben.

Ist der bestimmte U-Wert (der kleinere Wert von  $U_1$  und  $U_2$ ) kleiner oder gleich dem kritischen Wert  $U_{krit}(n_1, n_2, \alpha)$  wird die Nullhypothese verworfen. Wird die Nullhypothese verworfen liegt

keine Gleichverteilung der beiden Stichproben vor und somit signifikant unterschiedliche Mittelwerte. Der kritischen Wert  $U_{krit}(n_1, n_2, \alpha)$  wird durch das Signifikanzniveau  $\alpha$  und den beiden Stichprobenumfängen bestimmt [119, 120]. Als Signifikanzniveau wurde ein Niveau von 5 % gewählt. Die Durchführung eines U-Tests nach Mann, Whitney und Wilcoxon erfolgt mit der Software OriginPro 2015G, nach erfolgtem Test auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test (OriginPro 2015G).

### 3.2.6.6 Statistischer Signifikanztest nach Wilcoxon (Paardifferenzentest)

Der Wilcoxon-Test ist ein nichtparametrischer Signifikanztest mit welchem zwei voneinander abhängige Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz verglichen und auf Unterschiede überprüft werden können. Die abhängigen Variablen müssen ordinalskaliert sein, eine Normalverteilung muss nicht vorliegen. Der Wilcoxon-Test ist demnach ein nichtparametrisches Äquivalent des t-Test für abhängige Stichproben. Für die Berechnung der Teststatistik wird zunächst die Differenz jedes Messwertpaares berechnet, die Beträge der Differenz aufsteigend der Größe nach sortiert und anschließend mit Rängen versehen (Differenz  $\neq 0$ ). Nach der Rangierung erfolgt eine separate Notierung der positiven und negativen Rangplätze und die Berechnung der Rangsummen ( $T_+$ ,  $T_-$ ). Demnach berücksichtigt der Signifikanztest nach Wilcoxon sowohl die Vorzeichen als auch die Größe der Differenzen zwischen den Paaren [120]. Die Prüfgröße wird wie folgt bestimmt:

$$W = \min(T_+; T_-) \quad (12)$$

Dabei ist  $T_+$  die Summe der positiven Ränge und  $T_-$  die Summe der negativen Ränge.

Anschließend erfolgt ein Signifikanztest, durch eine z-Standardisierung des ermittelten W-Wertes und einem Vergleich des berechneten z-Wertes mit einem kritischen Wert der Standardnormalverteilung ( $n > 20$ ). Die Berechnung des z-Wertes erfolgt wie folgt:

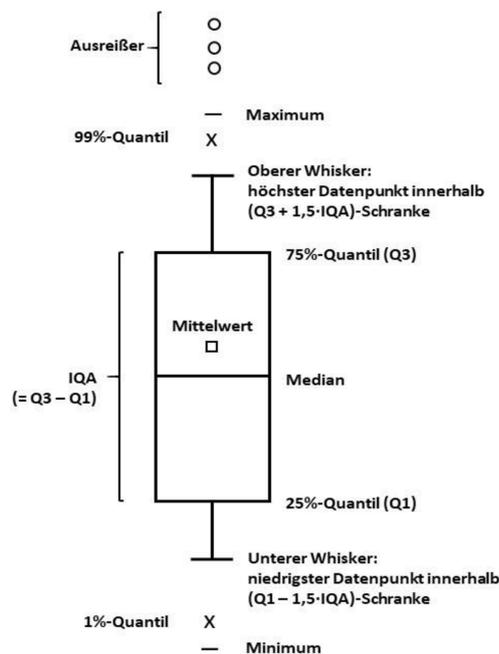
$$z = \frac{W - \mu_W}{\sigma_W} \quad (13) \quad \text{mit} \quad \mu_W = \frac{n \cdot (n + 1)}{4} \quad (14)$$

Dabei ist  $\sigma_W$  die Standardabweichung des W-Wertes,  $n$  die Anzahl der von Null verschiedenen Paardifferenzen und  $\mu_W$  der Erwartungswert des W-Wertes unter Gültigkeit der Nullhypothese.

Um Unterschiede zwischen beispielsweise unterschiedlichen Belastungszeitpunkten bei sportlicher Aktivität von Probanden festzustellen, wurde ein Wilcoxon-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein Niveau von 5 % gewählt. Die Durchführung eines Signifikanztests nach Wilcoxon erfolgte mit der Software OriginPro 2015G, nach erfolgtem Test auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test (OriginPro 2015G).

### 3.2.6.7 Box-Whisker-Plots

Für die grafische Darstellung von Daten und deren Verteilung wurden Box-Whisker-Plots verwendet. In einem Box-Whisker-Plot werden verschiedene Kennwerte (z. B. Streuungs- und Lagemaßen) in einer Grafik zusammengefasst dargestellt [121]. Die verwendeten Kennwerte sind der Median, zwei Quartile (25 %- und 75 %-Quartile) und z. B. die beiden Extremwerte (Whisker). Durch die verwendete Box wird der Bereich dargestellt in dem 50 % der Daten liegen. Die Box wird durch zwei Quartile, dem 25 %- (unteres Quartil) und dem 75 %-Quartil (oberes Quartil), begrenzt. Durch die Länge der Box wird die Streuung der Daten durch den Interquartilsabstand (Abk.: IQA) beschrieben. Mit Hilfe der Whisker werden Daten außerhalb der Box dargestellt. Die Whisker können hierbei verschiedene Kennwerte angeben, wie die Maximalwerte, das 5 %- und 95 %-Quartil oder auch den eineinhalbfachen Interquartilsabstand. Ausreißer, werden außerhalb der Whisker dargestellt (siehe Kapitel 3.2.6.8). Box-Whisker-Plots sind sehr hilfreich für den Vergleich von Datensätzen und die erste Interpretation dieser Datensätze. Die in dieser Arbeit erstellten Box-Whisker-Plots wurden mit der Software OriginPro 2015G erstellt und für die Bestimmung der Whisker der eineinhalbfache Interquartilsabstand (1,5 IQA) gewählt. Die Whiskerlänge wird hierbei von dem am weitesten außenstehenden Datenpunkt, welcher noch innerhalb der eineinhalbfachen Interquartilsabstandsschranke liegt, definiert. Ein Box-Whisker-Plot mit Kennlinien ist im Folgenden dargestellt (Abbildung 6):



**Abbildung 6: Darstellung eines Box-Whisker-Plots mit zugehöriger Interpretation der Kennlinien.**

Die angegebenen Kennlinien bzw. Kenngrößen, entsprechen den in dieser Arbeit verwendeten Kenngrößen.

### 3.2.6.8 Ausreißer

Die Identifikation von Ausreißern erfolgte über den Interquartilsabstand. Ergebnisse, die außerhalb des Interquartilsabstands lagen, d. h. kleiner waren als „ $Q1 - 1,5 \cdot IQA$ “ bzw. größer als „ $Q3 + 1,5 \cdot IQA$ “, wurden als Ausreißer definiert.

### 3.2.6.9 Analyse von Datenpunkten außerhalb der Bestimmungsgrenzen

Fehlende Konzentrationsergebnisse für die analysierten Proben waren zumeist bedingt durch Matrixkonzentrationen, die außerhalb der Bestimmungsgrenzen der Simoa-Assays lagen. Um den erhaltenen Informationsgehalt nicht zu minimieren, wurden für die statistische Auswertung der Daten, Werte unterhalb des LLoQ-Wertes durch den LLoQ-Wert (Matrixkonzentration) ersetzt und Werte oberhalb des ULoQ-Wertes durch den ULoQ-Wert (Matrixkonzentration). Wurden aufgrund von technischen Problemen keine Ergebnisse erhalten, wurden betroffene Proben von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Entwicklung und Optimierung von Simoa-Immunoassays

Für die Analyse der Analyten IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-2, IL-17 und PCT im niedrigen  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ -Konzentrationsbereich wurden fünf hochsensitive Simoa-Immunoassays entwickelt. Die entwickelten Simoa-Assays sind Mikrosphären basierte ELISAs, die aufgrund von kleinen Reaktionsräumen und von Signalamplifikation den hochsensitiven Nachweis von niedrigkonzentrierten Analyten ermöglichen (siehe Kapitel 1.2) [1, 4, 14-16]. Verschiedene Parameter haben einen Einfluss auf die Qualität eines Immunoassays. Hierfür wurden während der Entwicklungsphase geeignete Antikörperpaare gesucht und die Assaybedingungen, wie Reagenzienkonzentration, Pufferzusammensetzung und Assayprotokoll optimiert.

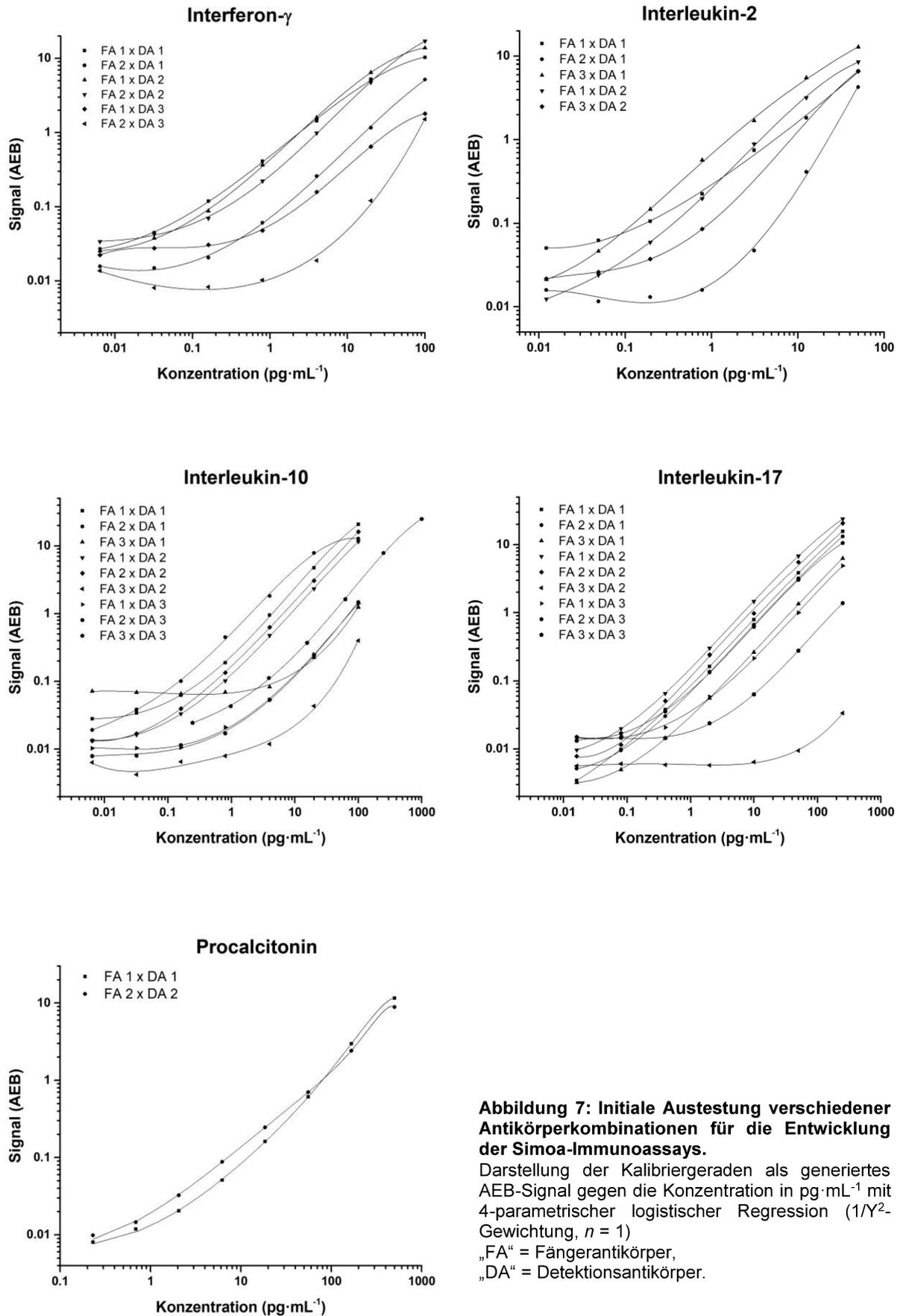
#### 4.1.1 Identifikation geeigneter Antikörperpaare

Für die Entwicklung der fünf Simoa-Assays wurden für jeden Analyten die besten Fänger- und Detektionsantikörper aus bis zu neun unterschiedlichen Antikörperpaarkombinationen (siehe Tabelle 3 bis Tabelle 5) ausgewählt. Die Ergebnisse der getesteten Kombinationen wurden basierend auf den Kalibriergeraden evaluiert. Hierbei war das Bewertungskriterium eine möglichst hohe Sensitivität, beurteilt durch das Signal-Rausch-Verhältnis (Abk.: S/N-Verhältnis), dem Hintergrundsignal und ggf. dem Kurvenverlauf.

Für die Entwicklung des IFN- $\gamma$  Immunoassays wurden sechs Antikörperpaarkombinationen (Abbildung 7) analysiert. Die Antikörperkombinationen FA1 x DA1 und FA1 x DA2 erzielten die höchsten Sensitivitäten. Die Antikörperkombination FA1 x DA1 hatte hierbei ein hohes Hintergrundsignal von 0,036 AEB und ein S/N-Verhältnis von 3,3 bei  $0,160 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  und 1,2 bei einer Analytkonzentration von  $0,032 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Für die Antikörperkombination FA1 x DA2 betrug das Hintergrundsignal 0,019 AEB und ergab ein S/N-Verhältnis von 4,5 (für  $0,160 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und 1,93 (für  $0,032 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Bei allen anderen getesteten Kombinationen lag das S/N-Verhältnis bei einer Konzentration von  $0,160 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  unter 2,5.

Für die IL-2 Assayentwicklung wurden fünf Antikörperpaarkombinationen getestet, von welchen die Kombinationen FA3 x DA1 und FA1 x DA2 die höchsten Sensitivitäten aufzeigten (Abbildung 7). Die S/N-Verhältnisse lagen bei 11,5 (FA3 x DA1) und 4,5 (FA1 x DA2) bei  $0,195 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  und bei 3,6 bzw. 1,8 bei einer Analytkonzentration von  $0,049 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , hierbei lag das Hintergrundsignal für beide Kombinationen bei 0,013 AEB.

Für die Etablierung des IL-10 Assays wurden neun Antikörperkombinationen getestet (Abbildung 7). Die Kombinationen FA1 x DA2, FA2 x DA1 und FA2 x DA2 ergaben die besten Ergebnisse bezüglich der Sensitivität. Die Hintergrundsignale der drei Kombinationen waren vergleichbar hoch und lagen zwischen 0,011 und 0,014 AEB.



**Abbildung 7: Initiale Austestung verschiedener Antikörperkombinationen für die Entwicklung der Simoa-Immunoassays.**

Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  mit 4-parametrischer logistischer Regression ( $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n = 1$ )

„FA“ = Fängerantikörper,  
 „DA“ = Detektionsantikörper.

Die S/N-Verhältnisse waren bei  $0,160 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  für die Kombinationen FA1 x DA2 und FA2 x DA2 größer 2,4 (aber  $< 7,4$ ) und lagen bei einer Analytkonzentration von  $0,032 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  bei 1,2 (FA1 x DA2) und 1,5 (FA2 x DA2). Mit der Antikörperkombination FA2 x DA1 ergaben sich S/N-Verhältnisse von 7,4 (für  $0,160 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und 2,8 (für  $0,032 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Bei allen anderen getesteten Kombinationen lag das S/N-Verhältnis bei einer Konzentration von  $0,160 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  unter 2,5.

Für die IL-17 Assayentwicklung wurden wiederum neun Kombinationen getestet, von denen fünf eine gute Sensitivität zeigten (Abbildung 7). Alle diese Kombinationen hatten bei einer Analytkonzentration von  $0,08 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  noch ein S/N-Verhältnis von  $> 2,0$  und ein Hintergrundsignal von  $< 0,007$  AEB. Mit dem Detektionsantikörper DA3 und der Antikörperkombination FA3 x DA2 wurde keine ausreichende Sensitivität erzielt.

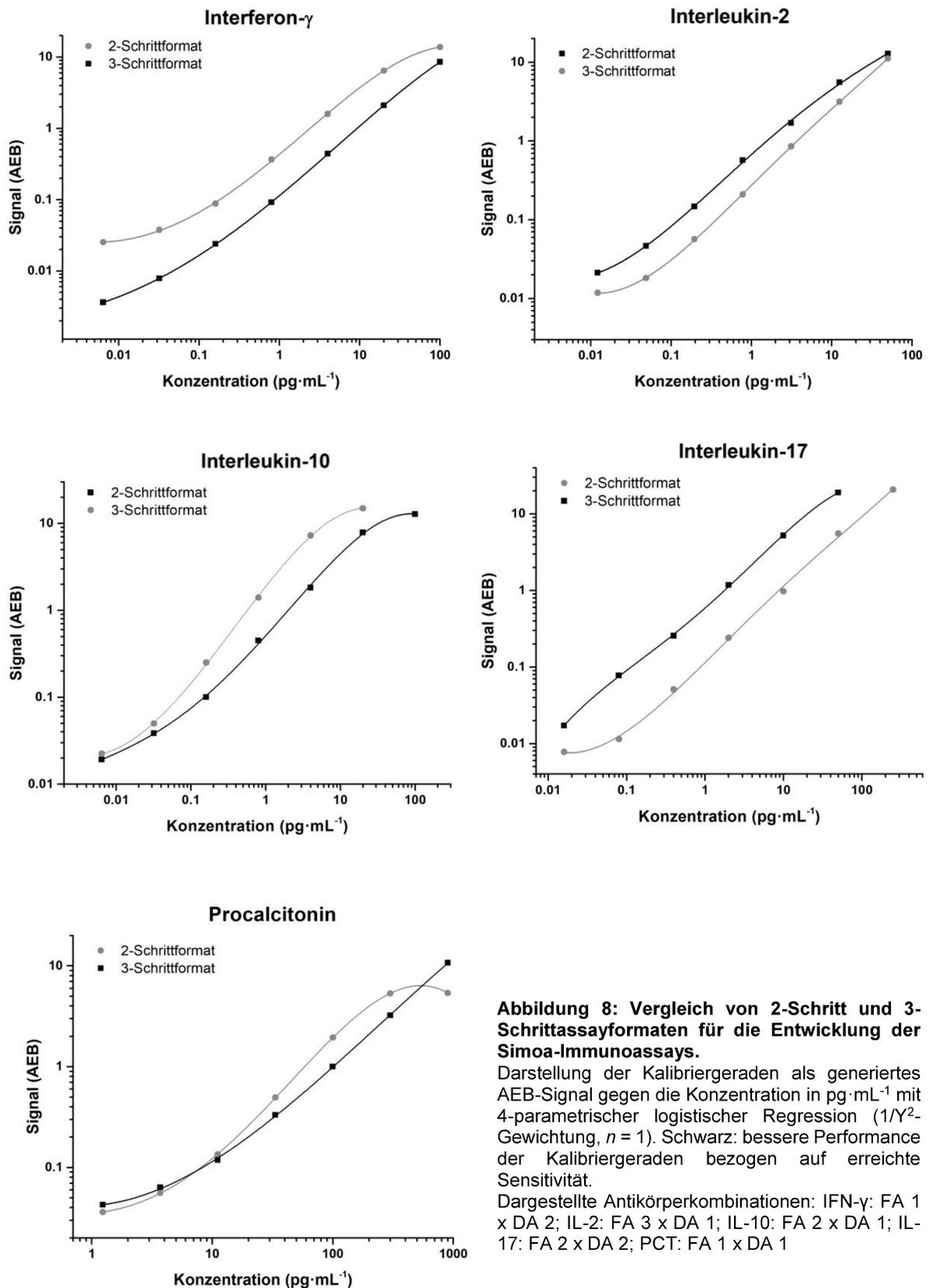
Für die Entwicklung eines PCT Simoa-Assays wurden zwei monoklonale Antikörper verwendet (Klon 4A6 und Klon 2F3). Diese Antikörper wurden als Antikörperpaar in einem Immunoassay (ELISA) mit hoher Affinität zu Procalcitonin und keiner Kreuzreaktivität zu Calcitonin und Katalcalcin beschrieben [122]. Für die Entwicklung wurden die beiden Antikörper jeweils als Fänger- und Detektionsantikörper (2 Kombinationen) getestet. Diese beiden Kombinationen wiesen vergleichbare Ergebnisse auf. Für beide Kombinationen war das Hintergrundsignal kleiner als 0,008 AEB. Die Kombination FA1 x DA1 (4A6 x 2F3) wies bei einer Analytkonzentration von  $0,230 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ein S/N-Verhältnis von 1,34 auf. Bei selber Konzentration lag das S/N-Verhältnis der Antikörperkombination FA2 x DA2 (2F3 x 4A6) bei 1,30. Die Ergebnisse der beiden Kombinationen waren demnach in Hinsicht auf die Sensitivität vergleichbar. Die finalen Antikörperkombinationen sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

#### 4.1.2 Ermittlung eines geeigneten Assayprotokolls

Um das geeignete Assayprotokoll für die jeweiligen Antikörperpaare zu bestimmen, wurden für die jeweils besten Kombinationen eines Analyten das 2- und 3-Schrittprotokoll getestet und gegenübergestellt (Abbildung 8).

Die Kalibriergeraden zeigten, dass die Simoa-Assays für IFN- $\gamma$ , IL-17 und PCT eine höhere Sensitivität bzw. einen besseren Kurvenverlauf, bei der Durchführung eines 3-Schrittprotokolls erreichten. Für IL-10 und IL-2 wurde eine höhere Sensitivität durch ein 2-Schrittassayformat erzielt (Abbildung 8).

IFN- $\gamma$  zeigte bei Verwendung des 3-Schrittprotokolls eine bessere Steigung der Kalibrationskurve über den gesamten Kurvenbereich und dadurch eine höhere Sensitivität. Das Hintergrundsignal lag bei 0,006 AEB und damit um den Faktor 3 niedriger als im 2-Schrittprotokoll.



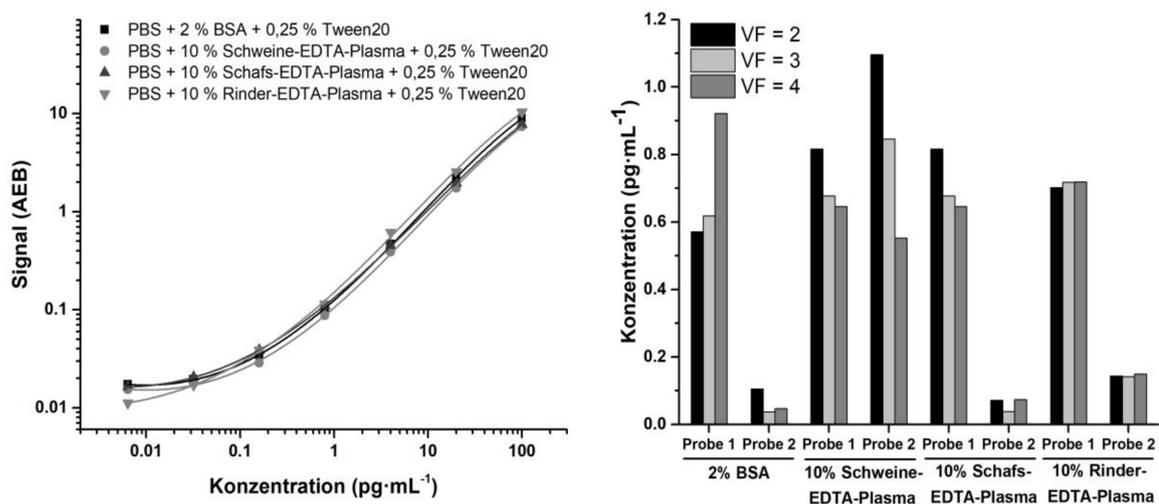
Die Protokollvergleiche der Simoa-Assays für IL-2 und IL-10 zeigten, dass unter Verwendung eines 2-Schrittprotokolls eine höhere Steigung im niedrigen Konzentrationsbereich erreicht werden konnte, mit jeweils vergleichbar niedrigem Hintergrundsignalen der beiden Assayformate.

Der Protokollvergleich für IL-17 ergab eine höhere Sensitivität im 3-Schrittprotokoll. Hier lag das S/N-Verhältnis bei 11,7 (für  $80,0 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) und bei 2,6 (für  $16,0 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Im Vergleich hierzu lag für beide Konzentrationen das S/N-Verhältnis im 2-Schrittprotokoll unter 2,2.

Die verschiedenen Formate ergaben für den PCT Simoa-Assay eine vergleichbare Sensitivität, jedoch mit einem generell besseren Kurvenlauf bei der Durchführung eines 3-Schrittassays. Die S/N-Verhältnisse im 3-Schrittformat lagen bei 408 (für  $900 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) und 122 (für  $300 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Im 2-Stufenformat lagen die S/N-Verhältnisse dieser beiden Konzentrationen bei 267 bis 270 und wiesen damit keinen Signalanstieg auf.

#### 4.1.3 Optimierung der Pufferzusammensetzung

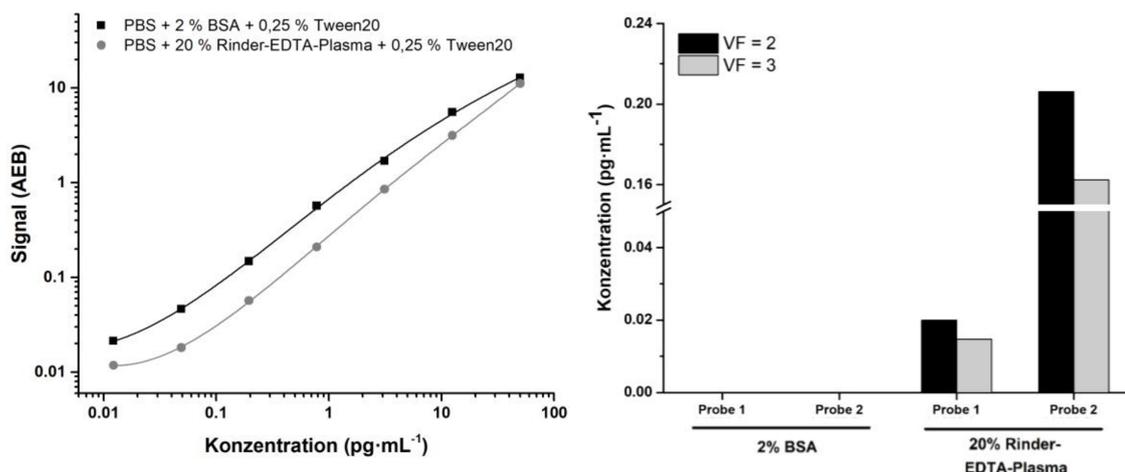
Für die Optimierung der Pufferzusammensetzung der Simoa-Assays wurden in einem Vorversuch Plasmaproben von verschiedenen Tieren, u. a. Rind, Schwein, Ratte, Schaf, Ziege und Pferd in PBS versetzt mit 0,25 % Tween20 (v/v) verdünnt und analysiert, um mögliche Kreuzreaktivitäten und ggf. Überlagerungseffekte (z. B. Matrixeffekte) aufzuzeigen (Ergebnisse nicht dargestellt). Als Referenzpuffer wurde hierfür PBS + 2 % BSA (w/v) + 0,25 % Tween20 (v/v) verwendet, da dieser Puffer zur Identifikation geeigneter Antikörperpaare eingesetzt wurde.



**Abbildung 9: Ergebnisse der Pufferoptimierung des IFN- $\gamma$  Simoa-Assays.**

Links: Direkter Vergleich der IFN- $\gamma$  Kalibriergeraden hergestellt in den zu testenden Puffern. Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  mit 4-parametrischer logistischer Regression ( $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n = 1$ ). Beste Performance der Kalibriergerade bezogen auf Sensitivität wurde erzielt mit 10% Rinder-EDTA-Plasma. Rechts: Serielle Verdünnung (Verdünnungsfaktoren: 2, 3, 4) zwei humaner Plasmaproben in den zu testenden Puffern. Dargestellt ist die rückgerechnete IFN- $\gamma$  Konzentration in  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors. Das beste Ergebnis bezogen auf die Linearität wurde mit dem Puffer PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) + 10 % Rinder-EDTA-Plasma (v/v) erreicht.

Durch Zusatz von EDTA-Plasma vom Schwein, Rind, oder Schaf wurden beim  $\text{IFN-}\gamma$  Assay die besten Ergebnisse erzielt. In einem zweiten Schritt wurde PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) mit 10 % (v/v) dieser tierischen EDTA-Plasmen versetzt und für die Herstellung der Kalibriergeraden und die Verdünnung von zwei humanen Plasmaproben zur Evaluierung der Messbarkeit des Analyten verwendet. Alle getesteten Puffer resultierten in vergleichbaren Kalibrierkurvenenergebnisse (Abbildung 9, links). Das Hintergrundsignal lag zwischen 0,014 und 0,016 AEB, während das S/N-Verhältnis bei  $160 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$  zwischen 2,0 (Rinder-EDTA-Plasma) und 2,4 (Schafs-EDTA-Plasma) lag. Die Ergebnisse der seriellen Verdünnung der humanen EDTA-Plasma-Proben zeigten, dass bei Zugabe von 10 % Rinder-EDTA-Plasma die beste Verdünnungslinearität erzielt wurde (Abbildung 9, rechts), da über drei Verdünnungsschritte (Verdünnungsfaktoren: 2, 3 und 4) eine Wiederfindungsrate bezogen auf den Mittelwert von 99 bis 105 % (Probe 1: 99–102 %; Probe 2: 101–105 %) erreicht wurde. Die Wiederfindungsraten in Puffern versetzt mit BSA, Schweine- beziehungsweise Schafs-EDTA-Plasma lag für die Probe 1 bei 76 bis 123 % und für die Probe 2 bei 65 bis 284 % (nicht linear). Um zu prüfen, ob durch eine höhere Rinder-EDTA-Plasmakonzentration im Assaypuffer eine höhere Sensitivität erreicht werden kann, wurde PBS versetzt mit 0,25 % Tween20 und 20 % Rinder-EDTA-Plasma verwendet (Ergebnisse nicht dargestellt). Das Hintergrundsignal war mit 0,009 AEB um den Faktor 1,5 niedriger als das erreichte Hintergrundsignal mit 10 % Rinder-EDTA-Plasma. Das S/N-Verhältnis lag bei 4,4 bei einer Konzentration von  $160 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$  im Vergleich zu 2,1 beim Einsatz von 10 % Rinder-EDTA-Plasma. Als finaler Assaypuffer wurde somit für den  $\text{IFN-}\gamma$  Assay PBS versetzt mit 20 % Rinder-EDTA-Plasma (v/v) und 0,25 % Tween20 (v/v) eingesetzt.



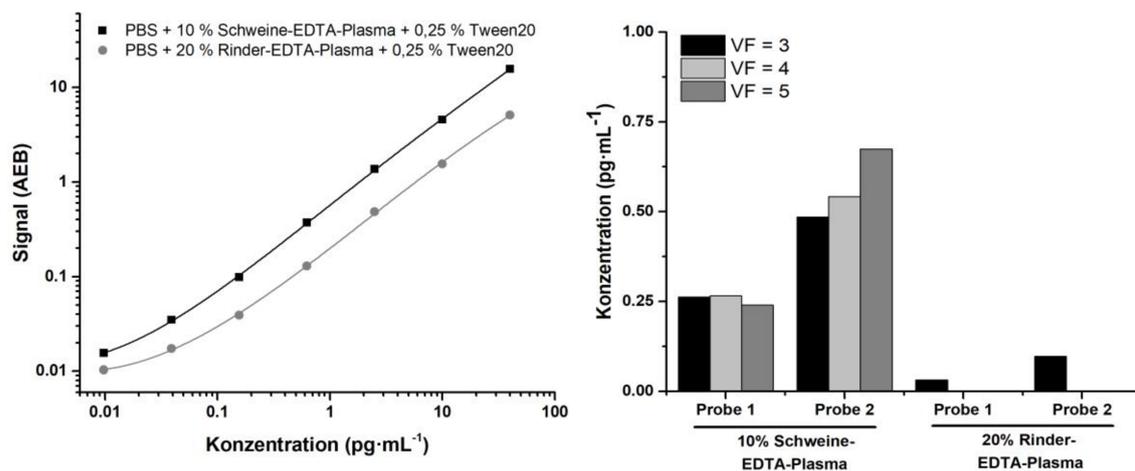
**Abbildung 10: Ergebnisse der Pufferoptimierung des IL-2 Simoa-Assays.**

Links: Direkter Vergleich der IL-2 Kalibriergeraden hergestellt in den zu testenden Puffern. Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  mit 4-parametrischer logistischer Regression ( $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n = 1$ ). Beste Performance der Kalibriergerade bezogen auf Sensitivität erzielt mit 2 % BSA. Rechts: Serielle Verdünnung (Verdünnungsfaktoren: 2, 3) zwei humaner Plasmaproben in den zu testenden Puffern. Dargestellt ist die rückgerechnete IL-2 Konzentration in  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren. Das beste Ergebnis bezogen auf die Linearität wurde mit dem Puffer PBS + 0,25 % Tween20 + 20 % Rinder-EDTA-Plasma erreicht.

Unter Verwendung von 20 % Rinder-EDTA-Plasma für den IL-2 Assay wurden die besten Ergebnisse erzielt (Abbildung 10).

Für die Untersuchung von humanen Proben und der Kalibriergeraden wurde PBS mit 0,25 % Tween20 und 20 % Rinder-EDTA-Plasma versetzt und mit einem BSA-Puffer verglichen. Die erhaltenen IL-2 Kalibriergeraden zeigten (Abbildung 10, links), dass durch die Verwendung von 20 % Rinder-EDTA-Plasma das Signal der Kalibriergeraden gedrückt wurde und damit ein Sensitivitätsverlust erfolgte. Das S/N-Verhältnis lag bei 1,9 bei einer Konzentration von  $4,88 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$  im Vergleich zu 3,6 bei Verwendung von PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) und 2 % BSA (w/v). Die Analyse der humanen EDTA-Plasmaproben zeigte jedoch, dass durch Verwendung des 20 % Rinder-EDTA-Plasma ein über die Verdünnungen lineares Signal generiert werden konnte (Abbildung 10, rechts). Die Wiederfindungsraten, berechnet über den Konzentrationsmittelwert, lagen für beide Proben zwischen 87 und 118 % und wiesen damit eine Verdünnungslinierität innerhalb der Akzeptanzkriterien auf. Mit BSA als Pufferzusatz konnten hingegen in den Proben kein Signal detektiert werden und somit auch keine Analytkonzentration ermittelt werden (Abbildung 10, rechts). Als finaler Assaypuffer wurde somit für den IL-2 Assay PBS versetzt mit 20 % Rinder-EDTA-Plasma (v/v) und 0,25 % Tween20 (v/v) eingesetzt.

Für die Simoa-Assays IL-10, IL-17 und PCT wurden bei der Analyse der verschiedenen Tier-EDTA-Plasmaproben die besten Ergebnisse mit 5 % (IL-10) bzw. 10 % Schweine-EDTA-Plasma (IL-17 und PCT) erzielt.



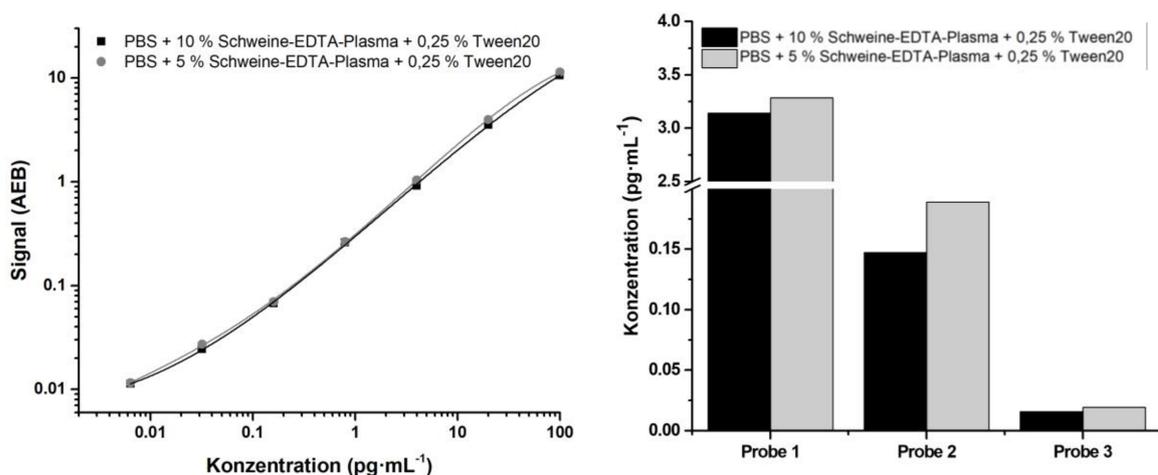
**Abbildung 11: Ergebnisse der Pufferoptimierung des IL-17 Simoa-Assays.**

Vergleich folgender Puffer: PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) versetzt mit 10 % Schweine-EDTA-Plasma (v/v) und PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) + 20 % Rinder-EDTA-Plasma (v/v); IFN- $\gamma$  und IL-2 Assaypuffer. Links: Direkter Vergleich der Kalibriergeraden. Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  mit 4-parametrischer logistischer Regression ( $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n = 1$ ). Beste Performance der Kalibriergerade bezogen auf Sensitivität wurde mit 10 % Schweine-EDTA-Plasma erzielt. Rechts: Serielle Verdünnung (Verdünnungsfaktoren: 3, 4, 5) von zwei humanen EDTA-Plasmaproben. Dargestellt ist die rückgerechnete IL-17 Konzentration in  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren. Das beste Ergebnis bezogen auf die Linearität wurde mit dem Puffer PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) + 10 % Schweine-EDTA-Plasma (v/v) erreicht.

Um das IL-17 Ergebnis zu verifizieren, wurde PBS versetzt mit 0,25 % Tween20 (v/v) und 10 % Schweine-EDTA-Plasma (v/v) bzw. 20 % Rinder-EDTA-Plasma (v/v) getestet und miteinander verglichen (Abbildung 11).

Durch die Verwendung von 20 % Rinder-EDTA-Plasma wurde das Signal der IL-17 Kalibriergeraden stark gedrückt und die Sensitivität sank, im Vergleich zu Kalibriergeraden in PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) + 10 % Schweine-EDTA-Plasma (v/v) (Abbildung 11, links). Das S/N-Verhältnis lag bei 2,3 (für  $9,77 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) im Vergleich zu 1,4 bei Verwendung von PBS versetzt mit 0,25 % Tween20 (v/v) und 20 % Rinder-EDTA-Plasma (v/v). Durch den Schweine-Plasmapuffer konnte in den humanen EDTA-Plasmaproben ein höheres und über drei Verdünnungen lineares Signal generiert werden (Abbildung 11, rechts). Die Wiederfindungsrate, berechnet über den Konzentrationsmittelwert, lag für Probe 1 zwischen 96 und 107 % und für Probe 2 zwischen 86 und 119 % und zeigten damit eine Parallelität.

Durch Zusatz von Schweine-EDTA-Plasma wurde für den IL-10 Assay die besten Ergebnisse erzielt. Getestet wurde der Assay mit den Puffern PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) versetzt mit 5 % bzw. 10 % Schweine-EDTA-Plasma (v/v).



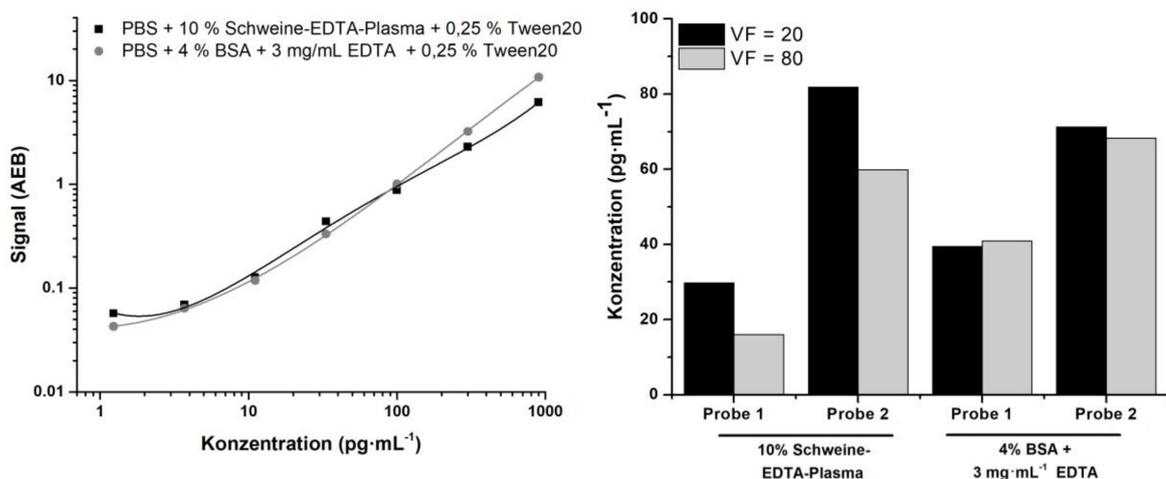
**Abbildung 12: Ergebnisse der Pufferoptimierung des IL-10 Simoa-Assays.**

Vergleich folgender Puffer: PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) versetzt mit 10 % bzw. 5 % Schweine-EDTA-Plasma (v/v). Links: Direkter Vergleich der Kalibriergeraden (4-parametrische logistische Regression,  $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n = 1$ ). Keine Unterschiede in der Performance der Kalibriergeraden bezogen auf Sensitivität. Rechts: Analyse von drei Proben verdünnt in beiden Puffern (VF = 3). Dargestellt ist die rückgerechnete IL-10 Konzentration in  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors. Unterschiede der ermittelten Konzentrationen der Proben lagen unter 15 %WF.

Es ergaben sich keine Unterschiede in der Performance der IL-10 Kalibriergeraden durch den Einsatz von 5 % bzw. 10 % Schweine-EDTA-Plasma (Abbildung 12, links). Das Hintergrundsignal lag für beide Puffer bei 0,006 AEB und das S/N-Verhältnis bei 4,0 (für  $3,20 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) mit 10 % Schweine-EDTA-Plasma bzw. bei 4,3 mit 5 % Schweine-EDTA-Plasma. Die Analyse humaner Proben resultierte in vergleichbaren Analytkonzentrationen. Drei Proben wurden in beiden Puffern 1:3 verdünnt und analysiert. Mit dem 5%igen Schweine-EDTA-Plasmapuffer wurden im Mittel um den Faktor 1,18 höhere Konzentrationen bestimmt (Abbildung 12, rechts). Die Wiederfindungsrate zwischen den beiden Puffern lag für alle drei

Proben zwischen 88 % und 114 % und war damit vergleichbar. Als finaler Assaypuffer (Tabelle 18) wurden für den IL-10 und den IL-17 Simoa-Assay PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) + 10 % Schweine-EDTA-Plasma (v/v) eingesetzt.

Während der PCT Assayentwicklung wurden die Puffer PBS + 4 % BSA (w/v) + 3,0 mg·mL<sup>-1</sup> EDTA + 0,25 % Tween20 (v/v) und PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) + 10 % Schweine-EDTA-Plasma (v/v) verglichen. Mit dem BSA-Puffer wurde sowohl eine höhere Assaysensitivität und eine bessere Verdünnungslinearität humaner Proben erreicht (Abbildung 13, links). Das S/N-Verhältnis lag für den BSA-Puffer bei 2,4 (für 3,70 pg·mL<sup>-1</sup>) im Vergleich zu 2,0 für den 10 % Schweine-EDTA-Plasmapuffer. Die Wiederfindungsrate der seriellen Probenverdünnung, berechnet über den Konzentrationsmittelwert, lag für beide Proben zwischen 98 und 102 % und zeigte damit eine gute Verdünnungslinearität (Abbildung 13, rechts). Im Vergleich hierzu lag die Wiederfindungsrate mit einem 10%igen Schweine-EDTA-Plasmapuffer zwischen 77 % und 143 % (Außerhalb der späteren Akzeptanzkriterien). Als finaler Assaypuffer (Tabelle 18) wurde für den PCT Simoa-Assay PBS + 4 % BSA (w/v) + 3,0 mg·mL<sup>-1</sup> EDTA + 0,25 % Tween20 (v/v) verwendet.



**Abbildung 13: Ergebnisse der Pufferoptimierung des PCT Simoa-Assays.**

Vergleich folgender Puffer: PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) + 10 % Schweine-EDTA-Plasma und PBS + 0,25 % Tween20 + 4 % BSA + 3,0 mg·mL<sup>-1</sup> EDTA (K2). Links: Direkter Vergleich der Kalibriergeraden (4-parametrische logistische Regression,  $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n=1$ ). Bessere Kalibriergeradenperformance mit BSA-Puffer. Rechts: Serielle Verdünnung (Verdünnungsfaktoren: 20, 80) von zwei humanen Plasmaproben. Dargestellt ist die rückgerechnete PCT Konzentration in pg·mL<sup>-1</sup> unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren. Das beste Ergebnis bezogen auf die Linearität wurde mit PBS + 0,25 % Tween20 (v/v) + 4 % BSA (w/v) + 3,0 mg·mL<sup>-1</sup> EDTA erhalten.

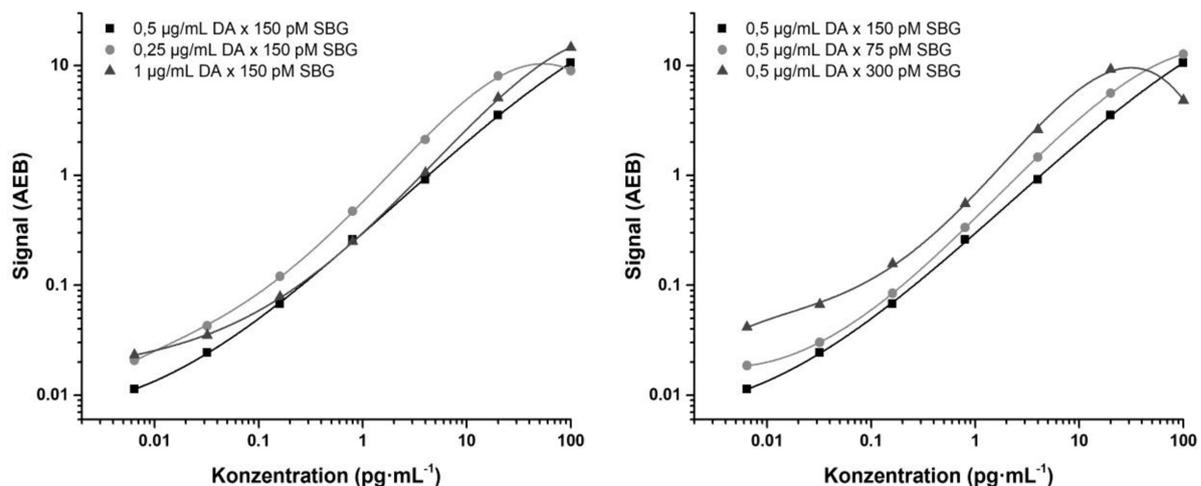
#### 4.1.4 Optimierung der Konzentrationen der Reagenzien

In einem weiteren Schritt wurde während der Entwicklung der Simoa-Assays getestet, ob durch Änderungen der Konzentrationen der Reagenzien während der Herstellung der einzelnen Assaykomponenten die Sensitivität und Performance der Assays gesteigert werden kann.

Für die Optimierung des IL-10 Simoa-Assays wurden die Detektionsantikörperkonzentrationen 0,25, 0,5 und 1,0 µg·mL<sup>-1</sup> (150 pM SBG-Konzentration) verglichen (Abbildung 14, links). Der

Vergleich der SBG-Konzentrationen von 300 pM und 75 pM erfolgte mit einer Konzentration an Detektionsantikörper von  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Abbildung 14, rechts). Das beste Ergebnis wurde mit  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper und 150 pM SBG erzielt (Tabelle 16). Das Hintergrundsignal lag bei 0,006 AEB und war um den Faktor 2,2 bis 6,1 niedriger als die Hintergrundsignale der anderen getesteten Konzentrationen. Das S/N-Verhältnis lag bei 4,0 (für  $32,0 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und 1,9 (für  $6,40 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Für beide genannten Konzentrationen lag das S/N-Verhältnis der anderen generierten Kalibriergeraden jeweils unter 2,3.

Die IL-2 Assayoptimierung zeigte, dass durch die Erhöhung der Konzentration des Detektionsantikörpers von  $0,5$  auf  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (150 pM SBG-Konzentration) die Sensitivität erhöht werden konnte (Abbildung 15, links). Die AEB-Werte der gesamten Kalibriergeraden stiegen, bei gleichbleibendem Hintergrundsignal (0,009 bis 0,01 AEB), an. Hierdurch wurden für die höhere Konzentration an Detektionsantikörper über den gesamten Kurvenbereich höhere S/N-Verhältnisse erzielt. Das S/N-Verhältnis lag bei 7,4 (für  $48,8 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und bei 3,2 (für  $12,2 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) im Vergleich zu 3,5 und 1,5 mit  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper.



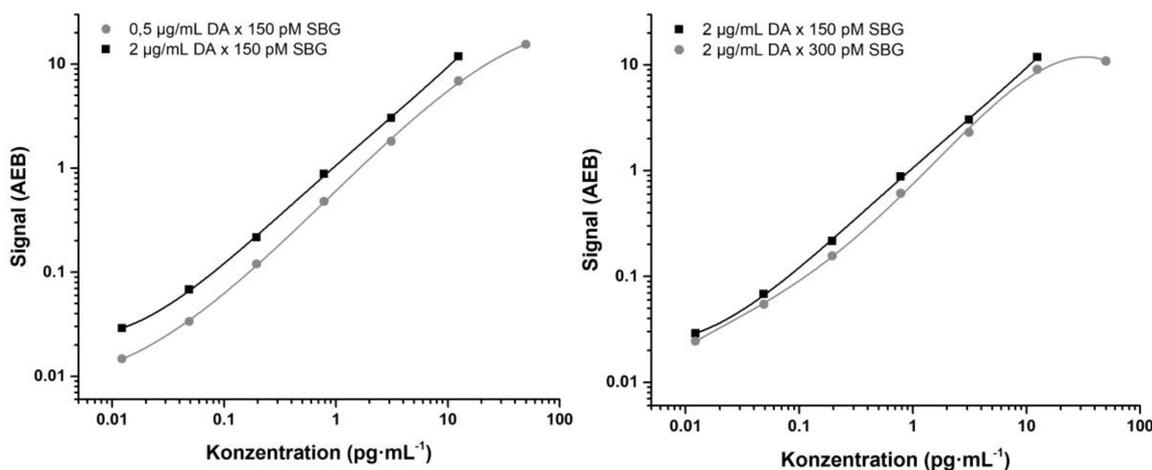
**Abbildung 14: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des IL-10 Simoa-Assays.** Direkter Vergleich der Kalibriergeraden erhalten mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Reagenzien. Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (4-parametrische logistische Regression,  $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n=1$ ). Schwarz: Kalibriergerade mit besserer Performance bezogen auf Sensitivität.  
Links: Kalibriergeraden mit 0,25, 0,50 und  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper und 150 pM SBG. Rechts: Kalibriergeraden mit 75, 150 und 300 pM SBG-Lösung ( $0,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper).

Eine Erhöhung der SBG-Konzentration von 150 pM auf 300 pM brachte keine Sensitivitätssteigerung (Abbildung 15, rechts). Das S/N-Verhältnis bei  $12,2 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$  lag mit 300 pM SBG bei 1,4 und war um den Faktor 2,2 niedriger als bei Verwendung von 150 pM SBG. Die final verwendeten Konzentrationen der Reagenzien für den IL-2 Simoa-Assay waren  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  des Detektionsantikörpers und 150 pM SBG (Tabelle 16).

Wie schon bei der Entwicklung des IL-2 Simoa-Assays, zeigte sich auch für die Assays IL-17 und PCT, eine Sensitivitätssteigerung durch Erhöhung der Konzentration des

Detektionsantikörpers.

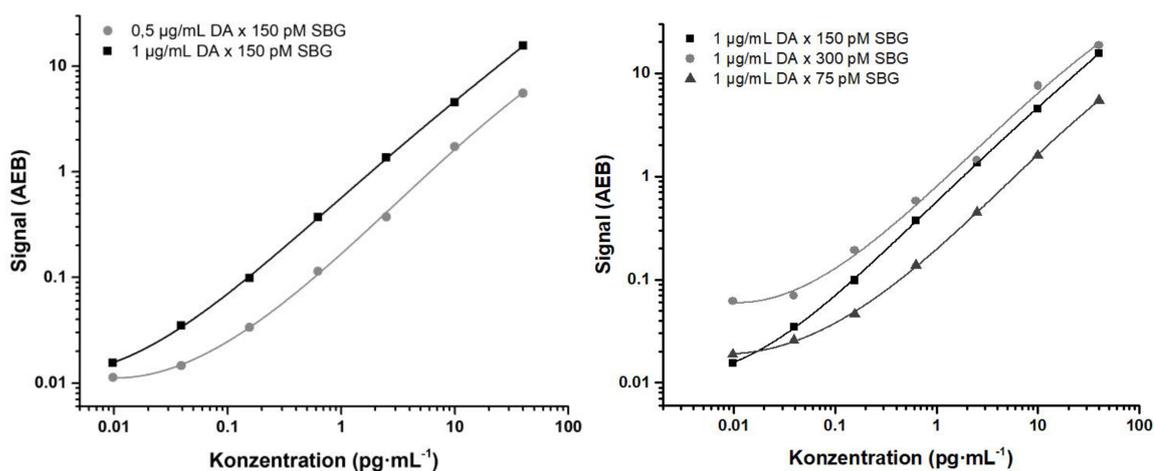
Durch eine Erhöhung des IL-17 Detektionsantikörpers von  $0,50$  auf  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  wurden über den gesamten Kurvenbereich höhere AEB-Werte generiert (Abbildung 16, links). Das Hintergrundsignal war mit  $0,004$  AEB um den Faktor 2 niedriger und zeigte den Signalanstieg nicht in gleicher Weise. Das S/N-Verhältnis lag bei  $3,7$  (für  $10,0 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und war um den Faktor  $2,7$  höher als mit einer Konzentration an Detektionsantikörper von  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Abbildung 15: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des IL-2 Simoa-Assays.**

Direkter Vergleich der Kalibriergeraden erhalten mit den unterschiedlichen Konzentrationen Reagenzien. Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (4-parametrische logistische Regression,  $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n=1$ ). Schwarz: Kalibriergerade mit besserer Performance bezogen auf Sensitivität.

Links: Kalibriergeraden mit  $0,50$  und  $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper ( $150 \text{ pM SBG}$ ). Rechts: Kalibriergeraden mit  $150$  und  $300 \text{ pM SBG}$  ( $2,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper).



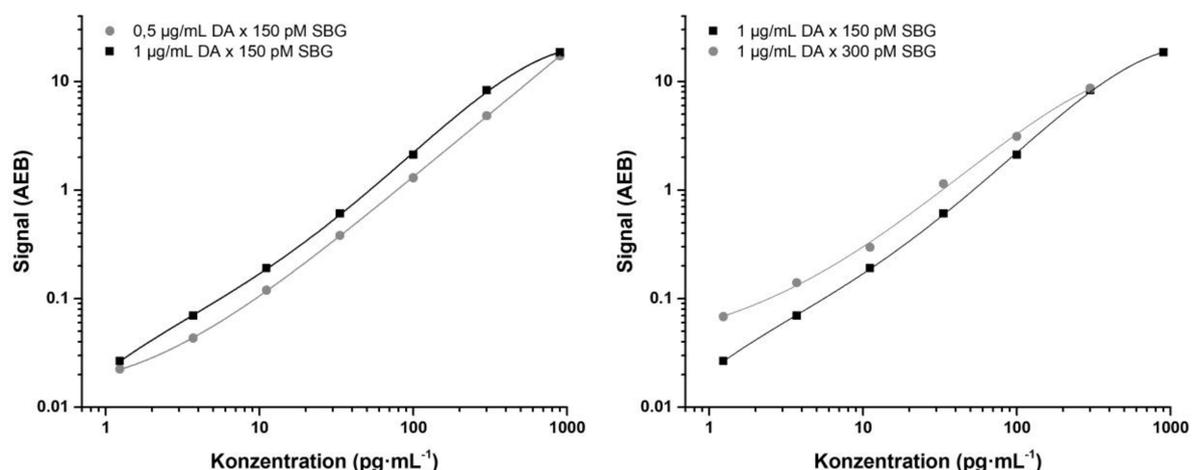
**Abbildung 16: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des IL-17 Simoa-Assays.**

Direkter Vergleich der Kalibriergeraden erhalten mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Reagenzien. Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (4-parametrische logistische Regression,  $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n=1$ ). Schwarz: Kalibriergerade mit besserer Performance bezogen auf Sensitivität.

Links: Kalibriergeraden mit  $0,50$  und  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper ( $150 \text{ pM SBG}$ ). Rechts: Kalibriergeraden mit  $30$ ,  $150$  und  $300 \text{ pM SBG}$  ( $1,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper).

Die Erhöhung der SBG-Konzentration für den IL-17 Assay von 150 auf 300 pM führte zu einem Sensitivitätsverlust (Abbildung 16, rechts). Die AEB-Werte der gesamten Kalibriergeraden stiegen an, gleichzeitig stieg jedoch auch das Hintergrundsignal auf 0,046 AEB an und war um den Faktor 11 höher als mit einer SBG-Konzentration von 150 pM. Das S/N-Verhältnis sank dabei auf 1,4 (für  $10,0 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) im Vergleich zu 3,7 mit 150 pM SBG. Mit 75 pM SBG sanken generell die AEB-Werte der Kalibriergeraden im Vergleich zu 150 pM SBG (Abbildung 16, rechts). Das S/N-Verhältnis sank ebenfalls von 3,7 auf 1,3 (für  $10,0 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) und der Assay verlor damit im Vergleich zu 150 pM SBG an Sensitivität. Das beste Ergebnis wurde demnach mit  $1,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper und 150 pM SBG erzielt (Tabelle 16).

Für den PCT Assay wurde eine Sensitivitätssteigerung, durch die Erhöhung der Konzentration des Detektionsantikörpers von 0,50 auf  $1,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , erzielt (Abbildung 17, links). Für beide Konzentrationen lag das Hintergrundsignal zwischen 0,008 und 0,009 AEB. Durch die erhöhten AEB-Werte der Kalibriergeraden mit  $1,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper wurden höhere S/N-Verhältnisse erhalten. Die S/N-Verhältnisse lagen bei 7,8 bzw. 5,2 (für  $3,7 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) und bei 3,0 bzw. 2,7 (für  $1,23 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Die Titration der SBG-Konzentration zeigte (Abbildung 17, rechts), dass mit 150 pM SBG die höchste Sensitivität und die beste Performance der Kalibriergerade erreicht wurden. Das S/N-Verhältnis der Kalibriergeraden generiert mit 150 pM SBG im Vergleich zu 300 pM SBG war bei einer Analytkonzentration von  $1,23 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  um den Faktor 1,7 höher. Das beste Ergebnis für den PCT Simoa-Assay wurde demnach mit  $1,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper und 150 pM SBG erzielt (Tabelle 16).

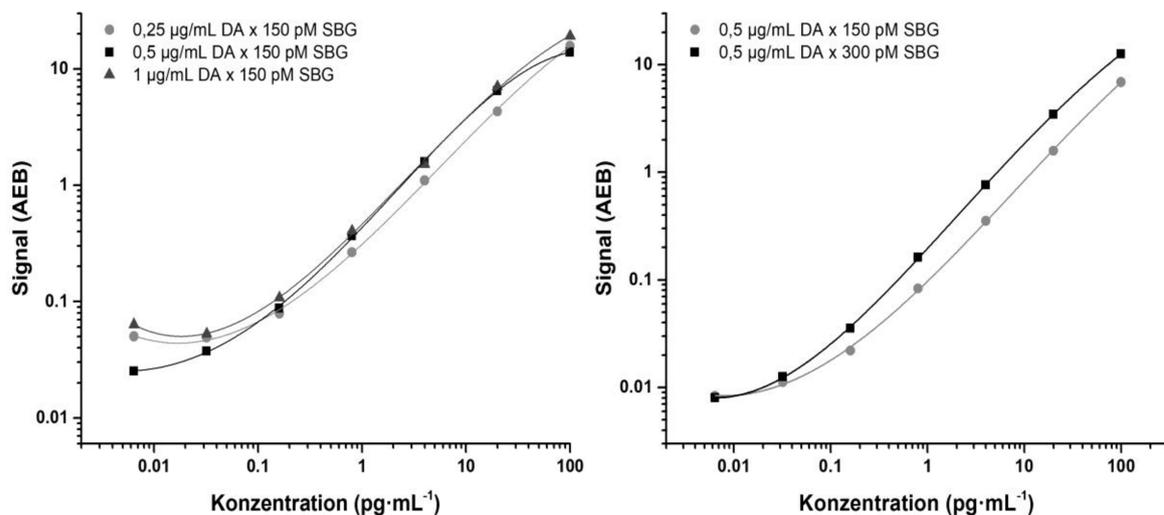


**Abbildung 17: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des PCT Simoa-Assays.**

Direkter Vergleich der Kalibriergeraden erhalten mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Reagenzien. Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in  $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (4-parametrische logistische Regression,  $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n=1$ ). Schwarz: Kalibriergerade mit besserer Performance bezogen auf Sensitivität.

Links: Kalibriergeraden mit 0,50 und  $1,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper (150 pM SBG). Rechts: Kalibriergeraden mit 150 und 300 pM SBG ( $1,00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper).

Die Optimierung des IFN- $\gamma$  Simoa-Assays bezüglich der Konzentrationen der Reagenzien zeigte (Abbildung 18), dass das beste Ergebnis der Kalibriergeraden mit einer Konzentration an Detektionsantikörper von  $0,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und einer SBG-Konzentration von  $300 \text{ pM}$  erzielt wurde. Während die Kurven, generiert mit den Detektionsantikörperkonzentrationen von  $0,25$  und  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , im unteren Kurvenbereich ( $160$  bis  $6,40 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) deutlich abflachten, wurde mit einer Konzentration von  $0,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bis zu einer Analytkonzentration von  $6,40 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ein absteigendes AEB-Signal generiert (Abbildung 18, links). Hierbei lagen die S/N-Verhältnisse für die Konzentrationen  $160$  und  $6,40 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$  bei  $4,5$  und  $1,3$ . Die Titration der SBG-Konzentration ergab für  $300 \text{ pM}$  SBG eine steilere Kalibriergerade (Abbildung 18, rechts) mit gleicher Sensitivität. Die Steigung der Kalibriergeraden mit  $300 \text{ pM}$  SBG war hierbei im Mittel um dem Faktor  $1,7$  höher. Die Hintergrundsignale beider Kurven lagen zwischen  $0,006$  AEB (für  $150 \text{ pM}$  SBG) und  $0,007$  AEB (für  $300 \text{ pM}$  SBG) bei gleichem AEB-Signal ( $0,008$  AEB) der niedrigsten getesteten Analytkonzentration. Das beste Ergebnis für den IFN- $\gamma$  Simoa-Assay wurde demnach mit  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper und  $300 \text{ pM}$  SBG erzielt (Tabelle 16).



**Abbildung 18: Ergebnisse der Optimierung der Konzentration der Reagenzien des IFN- $\gamma$  Simoa-Assays.**

Direkter Vergleich der Kalibriergeraden erhalten mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Reagenzien. Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (4-parametrische logistische Regression,  $1/Y^2$ -Gewichtung,  $n=1$ ). Schwarz: Kalibriergerade mit besserer Performance bezogen auf Sensitivität.

Links: Kalibriergeraden mit  $0,25$ ,  $0,50$  und  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper ( $150 \text{ pM}$  SBG). Rechts: Kalibriergeraden mit  $150$  und  $300 \text{ pM}$  SBG ( $0,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Detektionsantikörper).

## 4.2 Validierung der Simoa-Immunoassays

### 4.2.1 Validierungsrichtlinien und Parameter

Wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben erfolgte die Validierung der Simoa-Immunoassays in einem zweckgerichteten Ansatz unter Berücksichtigung von Richtlinien Europäischen Arzneimittel-Agentur und der US-amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel [23, 24] soweit

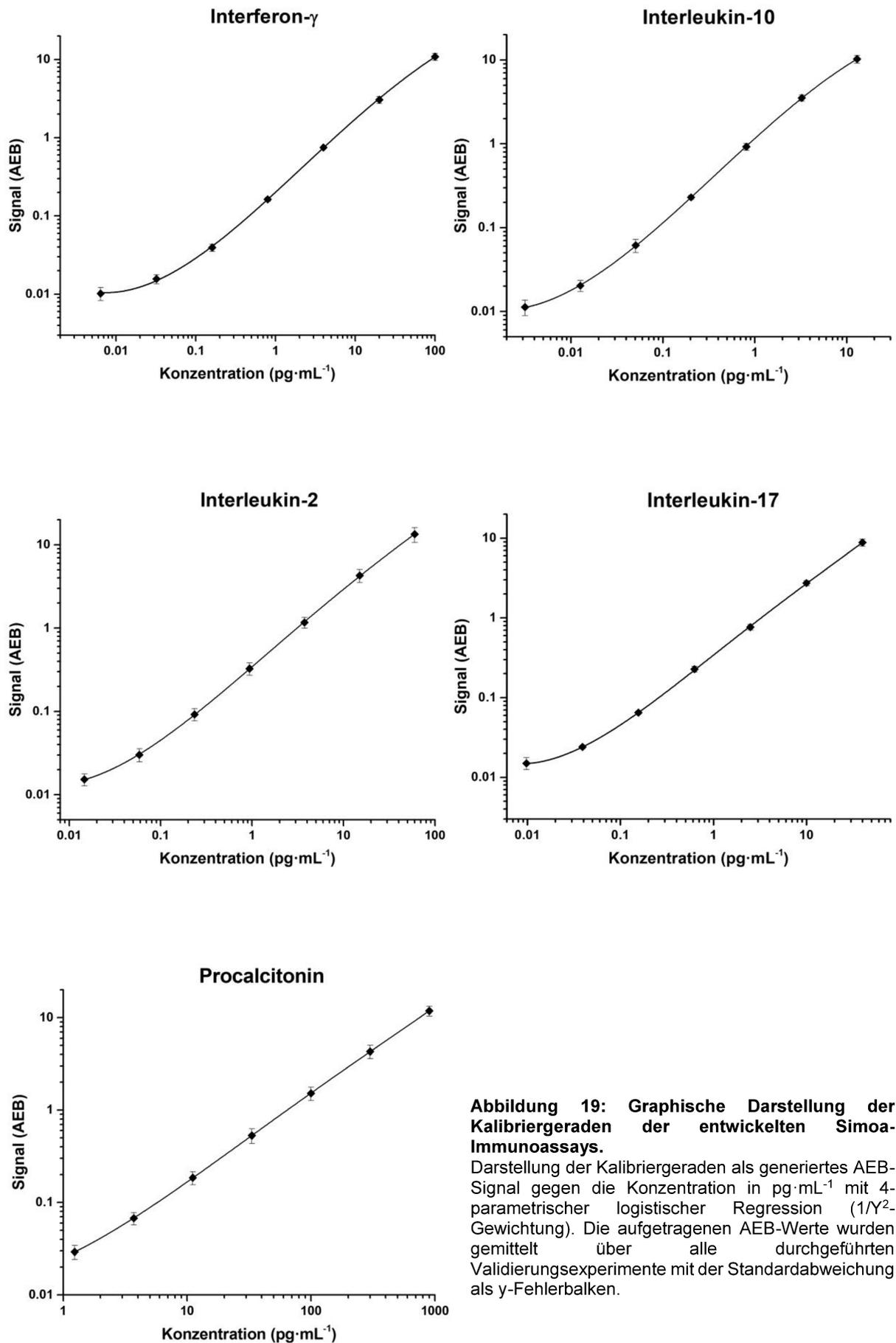
diese Richtlinien auf Immunoassays übertragbar waren. Während der Validierung wurden folgende Immunoassay-Parameter bestimmt: Kalibrierkurvenmodell, Bestimmungsgrenzen (obere- und untere Bestimmungsgrenze), Nachweisgrenze, Präzision (Intraassay- und Interassay-Präzision), Wiederfindungsrate, Verdünnungslinearität, Parallelität und Analytstabilität (Kurzzeitstabilität und die Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen).

#### 4.2.2 Validierung des Kalibrierkurvenmodells

Das Kalibrierkurvenmodell der Kalibrierkurven aller im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Simoa-Assays war ein 4-parametrisch logistischer Kurvenfit mit einer  $1/Y^2$ -Gewichtung. Eine Gewichtung wurde angewandt, da keine konstante Variabilität über den gesamten Kalibrierkurvenbereich vorlag. Die Gewichtung gleicht hierbei die steigende Größe der Residuen mit zunehmender Analytkonzentration aus. Beurteilt wurden die Ergebnisse anhand der ermittelten Wiederfindungsrate und der Präzision (Tabelle 27).

**Tabelle 27: Ergebnisse der Ermittlung der Kalibrierkurvenperformance.**

Simoa-Assay		Standardkalibratoren						
		CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4	CAL 5	CAL 6	CAL 7
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	100	20,0	4,00	0,800	0,160	0,032	0,0064
	Gemessene Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	101	19,3	4,16	0,815	0,154	0,033	0,0068
	VK (%)	1,3	3,3	4,2	2,5	3,2	9,9	16,4
	WFR (%)	101	96,4	104	102	96,2	102	106
	Anzahl Experimente	5						
<b>IL-2</b>	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	60,0	15,0	3,75	0,938	0,234	0,059	0,016
	Gemessene Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	60,5	14,8	3,67	0,968	0,246	0,058	0,015
	VK (%)	1,2	3,1	2,8	5,5	6,1	13,4	14,2
	WFR (%)	101	98,7	97,8	103	105	98,6	99,2
	Anzahl Experimente	5						
<b>IL-10</b>	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	13,0	3,25	0,813	0,203	0,051	0,013	0,0032
	Gemessene Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	12,8	3,56	0,816	0,190	0,049	0,012	0,0045
	VK (%)	1,8	5,0	3,0	3,0	6,9	9,8	17,1
	WFR (%)	98,2	110	100	93,6	96,0	96,4	141
	Anzahl Experimente	7						
<b>IL-17</b>	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	40,0	10,0	2,50	0,630	0,160	0,039	0,010
	Gemessene Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	40,4	9,71	2,49	0,668	0,156	0,035	0,012
	VK (%)	1,4	3,6	1,2	6,7	2,0	8,3	26,2
	WFR (%)	101	97,1	99,6	107	100	90,6	124
	Anzahl Experimente	4						
<b>PCT</b>	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	900	300	100	33,3	11,1	3,70	1,23
	Gemessene Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	908	299	100	33,8	11,2	3,66	1,23
	VK (%)	1,5	7,4	7,6	6,7	3,2	8,6	6,0
	WFR (%)	101	99,7	100	101	101	98,7	99,6
	Anzahl Experimente	8						



**Abbildung 19: Graphische Darstellung der Kalibriergeraden der entwickelten Simoa-Immunoassays.**

Darstellung der Kalibriergeraden als generiertes AEB-Signal gegen die Konzentration in pg·mL<sup>-1</sup> mit 4-parametrischer logistischer Regression ( $1/Y^2$ -Gewichtung). Die aufgetragenen AEB-Werte wurden gemittelt über alle durchgeführten Validierungsexperimente mit der Standardabweichung als y-Fehlerbalken.

Die festgelegten Akzeptanzkriterien waren eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 % (bezogen auf die eingesetzte nominale Konzentration) und eine Präzision von kleiner als 20 % VK der Replikate. Eine grafische Darstellung der Kalibriergeraden erfolgt in Abbildung 19.

Durch den gewählten 4-parametrischen logistischen Kurvenfit mit einer Gewichtung von  $1/Y^2$  konnte für die Analyten IFN- $\gamma$ , IL-2 und PCT eine sehr gute Kurvenanpassung erreicht werden. Die Wiederfindungsrate der gemessenen zu der eingesetzten nominalen Kalibratorkonzentration lag über den gesamten Kurvenbereich für IFN- $\gamma$  zwischen 96,2 und 106 %, für IL-2 zwischen 97,8 und 105 % und für PCT zwischen 98,7 und 101 % (Tabelle 27). Die ermittelten Variationskoeffizienten der Kalibrierpunkte lagen für IFN- $\gamma$  zwischen 1,3 und 16,4 %, für IL-2 zwischen 1,2 und 14,2 % und für PCT zwischen 1,5 und 8,6 %.

Für IL-10 ergab die Kurvenanpassung für den Kalibrator CAL 7 eine, bezogen auf die Akzeptanzkriterien, erhöhte Wiederfindungsrate von 141 %. Für die Standardkalibratoren CAL 1 bis CAL 6 lag die Wiederfindungsrate zwischen 93,6 und 110 % und die Präzision zwischen 1,8 und 9,8 %. Für IL-17 ergab die Kurvenanpassung für den Standardkalibrator CAL 7 ebenfalls eine bezogen auf die Akzeptanzkriterien erhöhte Wiederfindungsrate von 124 % mit einer erhöhten Präzision von 26,2 %. Für die Standardkalibratoren CAL 1 bis CAL 6 lag die Wiederfindungsrate jedoch immer zwischen 90,6 und 17 %, sowie die Präzision zwischen 1,2 und 8,3 %.

Die Ergebnisse der Kalibrierung mit WHO-Referenzmaterial (Tabelle 28) zeigten, dass das Einführen eines Korrekturfaktors für die drei untersuchten Simoa-Assays notwendig war, um die verwendeten kommerziellen Standardproteine an die Referenzwerte anzupassen. Für die nicht dargestellten Assays waren keine Referenzmaterialien erhältlich.

**Tabelle 28: Ergebnisse der Kalibrierung der Kalibrierkurven mit WHO-Referenzmaterial.**

„NQ“ = nicht quantifizierbar, „< LLoQ“ = Konzentrationswert unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze.

Simoa-Assay		WHO-Referenzstandard						
		WHO 1	WHO 2	WHO 3	WHO 4	WHO 5	WHO 6	WHO 7
<b>IL-2</b>	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	60	15	3,75	0,938	0,234	0,0586	0,0146
	Bestimmte Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	56,0	14,7	3,33	0,760	0,171	0,0360	< LLoQ
	Korrekturfaktor.	0,933	0,982	0,888	0,811	0,729	0,615	NQ
	Gemittelter Korrekturfaktor				0,826			
<b>IL-10</b>	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	13,0	3,25	0,813	0,203	0,0508	0,0127	0,00317
	Bestimmte Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	NQ	4,67	0,955	0,240	0,0648	0,0183	< LLoQ
	Korrekturfaktor	NQ	1,44	1,18	1,18	1,28	1,44	NQ
	Gemittelter Korrekturfaktor				1,30			
<b>IL-17</b>	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	40,0	10,0	2,50	0,630	0,160	0,0391	0,00977
	Bestimmte Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	41,2	10,5	2,37	0,549	0,133	0,0294	< LLoQ
	Korrekturfaktor	1,03	1,05	0,947	0,878	0,851	0,752	NQ
	Gemittelter Korrekturfaktor				0,918			

Der bestimmte Korrekturfaktor für IL-2 lag bei 0,826, d. h. 1,0 pg des im Simoa-Assays verwendeten IL-2 Standardproteins entsprach ca. 0,826 pg des WHO-Referenzmaterials. Der bestimmte Korrekturfaktor für IL-10 lag bei 1,30, hier entsprach 1,0 pg des im Simoa-Assays verwendeten IL-10 Standardproteins ca. 1,30 pg des WHO-Referenzmaterials. Der bestimmte Korrekturfaktor für IL-17 lag bei 0,918, d. h. 1,0 pg des im Simoa-Assays verwendeten IL-17 Standardproteins entsprach ca. 0,918 pg des WHO-Referenzmaterials.

#### 4.2.3 Bestimmung der Bestimmungsgrenzen

Für die Bestimmung der unteren Bestimmungsgrenze (engl.: Lower Limit of Quantification, Abk.: LLoQ) waren die festgelegten Akzeptanzkriterien eine Wiederfindungsrate von 75 bis 125 % und eine Präzision von kleiner als 25 % VK. Als untere Bestimmungsgrenze wurde die niedrigste Konzentration definiert, bei welcher beide Kriterien erfüllt wurden.

**Tabelle 29: Ergebnisse der Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze.**

„VK“ = Variationskoeffizient, „WFR“ = Wiederfindungsrate.

Simoa-Assay		Untere Bestimmungsgrenze						
		LLoQ 1	LLoQ 2	LLoQ 3	LLoQ 4	LLoQ 5	LLoQ 6	LLoQ 7
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Nominale Konz. (fg·mL <sup>-1</sup> )	400	200	100	50,0	25,0	12,5	6,25
	Bestimmte Konz. (fg·mL <sup>-1</sup> )	429	210	106	53,2	25,5	17,0	13,2
	VK (%)	6,1	11,6	9,9	24,6	14,8	30,3	29,9
	WFR (%)	107	105	106	106	102	136	210
<b>IL-2</b>	Nominale Konz. (fg·mL <sup>-1</sup> )	469	234	117	58,6	29,3	14,6	7,32
	Bestimmte Konz. (fg·mL <sup>-1</sup> )	471	245	124	61,9	31,6	16,0	77,8
	VK (%)	9,6	4,6	4,4	8,8	20,6	29,9	33,5
	WFR (%)	101	105	106	106	108	109	161
<b>IL-10</b>	Nominale Konz. (fg·mL <sup>-1</sup> )	102	50,8	25,4	12,7	6,35	3,17	1,59
	Bestimmte Konz. (fg·mL <sup>-1</sup> )	97,9	46,9	23,9	12,3	5,82	4,78	2,37
	VK (%)	0,9	5,9	6,7	4,4	4,1	62,7	59,8
	WFR (%)	96,4	92,4	94,2	96,8	91,7	151	149
<b>IL-17</b>	Nominale Konz. (fg·mL <sup>-1</sup> )	313	156	78,1	39,1	19,5	9,77	4,88
	Bestimmte Konz. (fg·mL <sup>-1</sup> )	367	180	84,6	38,8	21,5	12,2	11,2
	VK (%)	10,1	6,6	4,5	3,6	18,0	1,6	37,9
	WFR (%)	117	115	108	99,4	111	125	230
<b>PCT</b>	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	16,7	8,3	4,17	2,08	1,04	0,521	0,260
	Bestimmte Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	15,0	7,27	3,98	1,94	1,01	0,654	0,396
	VK (%)	17,1	8,3	5,3	10,5	17,5	34,5	12,4
	WFR (%)	90,3	87,3	95,5	93,3	96,6	126	152

Die LLoQ-Bestimmung zeigte, dass für alle Analyten die 1:32-Verdünnung des jeweiligen Standardkalibrators CAL 4 (entspricht dem LLoQ 5-Wert in Tabelle 29) die höchste Verdünnung war, bei welcher die festgelegten Akzeptanzkriterien noch erfüllt wurden. Daraus resultierten für die entwickelten Simoa-Assays die in Tabelle 30 gelisteten LLoQ-Werte.

**Tabelle 30: Ermittelten Bestimmungsgrenzen der entwickelten Simoa-Immunoassays.**

Angabe der jeweiligen Bestimmungsgrenzen in Assaykonzentrationen (keine Einberechnung der Verdünnungsfaktoren).

Bestimmungsgrenzen	Simoa-Assay				
	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-10	IL-17	PCT
LLoQ (fg·mL <sup>-1</sup> )	25,0	29,3	6,35	19,5	1220
ULoQ (pg·mL <sup>-1</sup> )	100	60,0	13,0	40,0	900

Für PCT lag der experimentell ermittelte LLoQ-Wert mit 1,04 pg·mL<sup>-1</sup> unterhalb des CAL 7-Kalibrators und wurde daher auf 1,22 pg·mL<sup>-1</sup> (CAL 7) erhöht. Die bestimmten LLoQ-Werte der restlichen Assays lagen um den Faktor 1,2 bis 3,9 oberhalb der jeweiligen CAL 7-Konzentration. Die Ergebnisse der 1:256-Verdünnung (entspricht dem LLoQ 8-Wert) sind nicht dargestellt, da bereits die LLoQ-Werte 6 und 7 die Akzeptanzkriterien nicht erfüllten.

Die Bestimmung der oberen Bestimmungsgrenze (engl.: Upper Limit of Quantification, Abk.: ULoQ) erfolgte aus den generierten Ergebnissen der Kalibrierkurven in vier bis acht unabhängigen Experimenten. Die festgelegten Akzeptanzkriterien waren wiederum eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 % und eine Präzision von kleiner als 20 % VK.

Die Ergebnisse (Tabelle 27) zeigten, dass für alle entwickelten Simoa-Assays der jeweilige höchste Standardkalibrator (CAL 1) die erforderlichen Akzeptanzkriterien erfüllte. Daraus resultierten für die entwickelten Simoa-Assays die in Tabelle 30 gelisteten ULoQ-Werte.

#### 4.2.4 Bestimmung der Nachweisgrenze

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze (engl.: Limit of Detection, Abk.: LoD) wurden in einem Validierungslauf zwischen 20 und 24 Replikate des Nullwertkalibrators (CAL 8) analysiert. Für die Definition der Nachweisgrenze wurden keine Akzeptanzkriterien festgelegt. Aus den Ergebnissen der Bestimmung der Nachweisgrenzen resultierten für die Simoa-Assays die in Tabelle 31 gelisteten LoD-Werte.

**Tabelle 31: Ergebnisse der Bestimmung der Nachweisgrenzen.**

Bestimmung der Nachweisgrenze	Simoa-Assay				
	IFN- $\gamma$	IL-2	IL-10	IL-17	PCT
Replikate CAL 8 (N)	20	23	24	20	23
Mittelwert CAL 8 (AEB)	0,00724	0,0117	0,00501	0,0118	0,0163
Standardabweichung CAL 8 (AEB)	0,00121	0,00178	0,000705	0,00156	0,00197
Lin. Regression – Steigung	0,248	0,349	1,24	0,348	0,0170
Lin. Regression – y-Achsenabschnitt	0,00786	0,0109	0,00640	0,0112	0,0147
Lin. Regression – Bestimmtheitsmaß	0,9722	0,9918	0,9600	0,9994	0,9958
Nachweisgrenze (fg·mL <sup>-1</sup> )	12,1	17,6	0,591	15,2	438

#### 4.2.5 Bestimmung der Präzision

Die Intraassay- und Interassay-Präzision wurden mit QC-Proben (Tabelle 20) im hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich der Simoa-Immunoassays bestimmt. Die festgelegten Akzeptanzkriterien waren ein VK % von kleiner als 15 % im mittleren Konzentrationsbereich und kleiner als 20 % im niedrigen und hohen Konzentrationsbereich. Die Ergebnisse der Intraassay-Präzision (Tabelle 32) zeigten, dass für alle Analyten die Akzeptanzkriterien erfüllt wurden.

**Tabelle 32: Ergebnisse der Intraassay-Präzisionsbestimmung.**

Angabe der jeweiligen Analytlevel in Assaykonzentrationen (keine Einberechnung der Verdünnungsfaktoren).

Simoa-Assay		Intraassay-Präzision - Konzentrationsbereich		
		Hoch	Mittel	Niedrig
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Bestimmte Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	11,7	0,550	0,106
	VK (%)	6,7	4,6	16,1
<b>IL-2</b>	Bestimmte Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	8,19	0,341	0,0606
	VK (%)	9,1	10,3	12,3
<b>IL-10</b>	Bestimmte Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	3,74	0,186	0,0222
	VK (%)	11,2	3,4	7,0
<b>IL-17</b>	Bestimmte Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	17,2	0,245	0,0382
	VK (%)	5,7	5,5	11,0
<b>PCT</b>	Bestimmte Konz.(pg·mL <sup>-1</sup> )	292	13,7	4,56
	VK (%)	14,9	13,5	12,9

Für INF- $\gamma$  ergab die Bestimmung der Intraassay-Präzision, für die drei analysierten QC-Proben, Variationskoeffizienten zwischen 4,6 und 16,1 %. Die Variationskoeffizienten der Intraassay-Präzisionsbestimmung lagen für IL-2 bei 9,1 bis 12,3 %, für IL-10 bei 3,4 bis 11,2 %, für IL-17 bei 5,5 bis 11,0 und für PCT bei 12,9 bis 15,3 % (jeweils n = 12).

Die festgelegten Akzeptanzkriterien für die Bestimmung der Interassay-Präzision waren ein VK % von kleiner 20 % im mittleren und hohen Konzentrationsbereich und kleiner als 30 % im niedrigen Konzentrationsbereich (2·5·LLoQ).

Die Ergebnisse der Interassay-Präzisionsbestimmung zeigten (Tabelle 33), dass für alle Analyten die Akzeptanzkriterien erfüllt wurden. Für INF- $\gamma$  lagen die VK-Werte der QC-Proben zwischen 5,5 und 29,5 %. Die Variationskoeffizienten der Interassay-Präzisionsbestimmung lagen für IL-2 bei 7,3 bis 19,1 %, für IL-10 bei 6,9 bis 27,0 %, für IL-17 bei 5,9 bis 10,4 und für PCT bei 11,7 bis 28,9 %.

**Tabelle 33: Ergebnisse der Interassay-Präzisionsbestimmung.**

Angabe der jeweiligen Analytlevel in Assaykonzentrationen (keine Einberechnung der Verdünnungsfaktoren), „NV“ = Nicht vorhanden (es war keine Probe im entsprechenden Konzentrationsbereich vorgesehen).

Simoa-Assay		Interassay-Präzision - Konzentrationsbereich				
		QC 1	QC 2	QC 3	QC 4	QC 5
IFN- $\gamma$	Gemessene Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	12,3	0,522	0,275	0,125	0,0851
	VK (%)	5,5	11,8	11,7	12,4	29,5
	Anzahl Experimente	5				
IL-2	Gemessene Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	32,8	7,68	1,22	0,378	0,0574
	VK (%)	19,1	7,7	7,3	7,9	13,2
	Anzahl Experimente	5				
IL-10	Gemessene Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	4,10	0,193	0,0224	0,0124	NV
	VK (%)	6,9	8,0	15,9	27,0	
	Anzahl Experimente	7				
IL-17	Gemessene Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	14,7	1,67	0,268	0,0503	NV
	VK (%)	5,9	9,5	9,2	10,4	
	Anzahl Experimente	5				
PCT	Gemessene Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	434	105	27,1	7,08	5,57
	VK (%)	12,7	16,3	11,7	19,1	28,9
	Anzahl Experimente	7				

#### 4.2.6 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte mit den hierfür generierten Proben (Tabelle 21) im hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich. Das festgelegte Akzeptanzkriterium war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 %, bezogen auf die eingesetzte Konzentration des rekombinanten Proteins nach Abzug der endogenen Analytkonzentration.

**Tabelle 34: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederfindungsrate.**

Simoa-Assay		Wiederfindungsrate		
		WR 1	WR 2	WR 3
IFN- $\gamma$	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	30,0	3,00	0,300
	Bestimmte Konz.- Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	28,9	2,5	0,350
	WFR (%)	96,3	83,9	117
IL-2	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	40,0	2,80	0,280
	Bestimmte Konz.- Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	36,4	2,31	0,228
	WFR (%)	90,9	82,3	81,3
IL-10	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	24,0	2,00	0,160
	Bestimmte Konz.- Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	33,2	1,72	0,0768
	WFR (%)	138	108	96,0
IL-17	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	40,0	2,00	0,160
	Bestimmte Konz.- Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	46,8	2,22	0,168
	WFR (%)	117	111	105
PCT	Nominale Konz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	300	30,0	6,00
	Bestimmte Konz.- Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	269	27,1	5,91
	WFR (%)	89,8	90,6	98,5

Für die Analyten IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 und PCT erfüllten die bestimmten Wiederfindungsraten das Akzeptanzkriterium im hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich (Tabelle 34). Für IFN- $\gamma$  wurden Wiederfindungsraten zwischen 83,9 und 117 %, für IL-2 zwischen 81,3 und 90,9 %, für IL-17 zwischen 105 und 117 % und für PCT zwischen 89,8 und 98,5 % bestimmt. Für den Analyten IL-10 erfüllten im mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich die bestimmten Wiederfindungsraten, mit 108 % und 96,0 %, das Akzeptanzkriterium. Im hohen Konzentrationsbereich lag für IL-10 die Wiederfindungsrate bei 138 % und damit außerhalb des 80 bis 120 %-Bereiches.

#### 4.2.7 Bestimmung der Verdünnungslinearität

Die Bestimmung der Verdünnungslinearität erfolgte mit den hierfür generierten Proben (Tabelle 22). Das festgelegte Akzeptanzkriterium war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 %, bezogen auf den ermittelten 100 %-Wert. Für die Bestimmung des 100 %-Wertes (= Referenzwert) wurden die rückgerechneten Konzentrationen aller Verdünnungen (VL 1 – VL 8) gemittelt.

Die Ergebnisse zeigten, dass für die entwickelten Simoa-Assays die Verdünnungslinearität über den untersuchten Bereich gegeben war. Die Wiederfindungsraten lagen für IFN-  $\gamma$  bei 92,7 bis 113 %, für IL-2 bei 92,0 bis 115 %, für IL-10 bei 80,5 bis 120 %, für IL-17 bei 85,2 bis 118 % und für PCT bei 81,6 bis 117 % (Tabelle 35). Damit lagen alle Wiederfindungsraten innerhalb des definierten 80 bis 120 %-Bereiches. Für die Analyse von IFN- $\gamma$  war die Verdünnungslinearität bis zu einem Faktor von 3200 gegeben. Für IL-2 war die Verdünnungslinearität gegeben bis zu einem Faktor von 972, für IL-10 bis 3200, für IL-17 bis 1458 und für PCT bis zu einem Faktor von 4883. Die Verdünnungen DL 7 und DL 8 ergaben für IL-2 Werte unter dem LLoQ von 0,0293 pg·mL<sup>-1</sup>. Die Wiederfindungsraten für diese Verdünnungen konnten deshalb nicht bestimmt werden.

**Tabelle 35: Ergebnisse der Bestimmung der Verdünnungslinearität.**

„NQ“ = Nicht quantifizierbarer Wert, „< LLoQ“ = Konzentrationswert unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze, „NV“ = Nicht vorhanden (Probe war nicht vorgesehen), „WFR“ = Wiederfindungsrate.

Simoa-Assay		Verdünnungslinearität							
		VL 1	VL 2	VL 3	VL 4	VL 5	VL 6	VL 7	VL 8
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Verdünnungsfaktor (1:x)	5	50	100	200	400	800	1600	3200
	Assaykonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	27,1	2,73	1,35	0,683	0,352	0,161	0,0981	0,0447
	Matrixkonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	136	136	135	137	141	129	157	143
	Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	139							
	WFR (%)	97,5	97,9	97,2	98,2	101	92,7	113	103
<b>IL-2</b>	Verdünnungsfaktor (1:x)	4	12	36	108	324	972	2916	8748
	Assaykonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	25,4	7,32	2,25	0,839	0,251	0,0891	<LLoQ	<LLoQ
	Matrixkonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	101	87,9	81,1	90,6	81,2	86,7	NQ	NQ
	Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	88,1							
	WFR (%)	115	99,7	92,0	103	92,1	98,3	NQ	NQ
<b>IL-10</b>	Verdünnungsfaktor (1:x)	8	50	100	200	400	800	1600	3200
	Assaykonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	11,9	1,95	0,867	0,390	0,194	0,0934	0,0421	0,0202
	Matrixkonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	95,1	97,4	86,7	77,9	77,5	74,7	67,4	65,4
	Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	81,3							
	WFR (%)	117	120	107	96,0	95,5	92,0	83,0	80,5
<b>IL-17</b>	Verdünnungsfaktor (1:x)	2	6	18	54	162	486	1458	
	Assaykonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	30,6	9,17	3,02	0,931	0,278	0,0939	0,0296	
	Matrixkonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	61,3	55,0	54,3	50,3	45,0	45,6	43,2	NV
	Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	51,9							
	WFR (%)	118	106	105	96,8	86,7	87,9	85,2	
<b>PCT</b>	Verdünnungsfaktor (1:x)	8	20	50	125	313	781	1953	4883
	Assaykonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	536	229	103	42,5	18,2	6,83	2,86	1,26
	Matrixkonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	4291	4589	5138	5307	5708	5333	5583	6135
	Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )	5260							
	WFR (%)	81,6	87,2	97,7	101	109	101	106	117

#### 4.2.8 Bestimmung der Parallelität

Die Bestimmung der Parallelität erfolgte mit humanen EDTA-Plasmaproben welche seriell (Tabelle 23) verdünnt wurden.

Die bestimmten Konzentrationsmittelwerte wurden gemittelt und der erhaltene Konzentrationswert als 100 %-Wert eingesetzt. Das festgelegte Akzeptanzkriterium war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 %, bezogen auf den ermittelten Referenzwert.

Die Ergebnisse der Parallelitätsbestimmung (Tabelle 36) zeigten, dass für die entwickelten Simoa-Assays die Parallelität über den untersuchten Bereich gegeben war. Die bestimmten Wiederfindungsraten lagen für IFN- $\gamma$  bei 86,4 bis 119 %, für IL-10 bei 86,2 bis 109 % und für PCT bei 91,9 bis 115 % und damit innerhalb des 80 bis 120 %-Bereiches. Die Bestimmung der Parallelität für IL-17 konnte nur über zwei Verdünnungen (1:2 und 1:4) untersucht werden, da keine humane EDTA-Plasma Probe mit höherer endogener Analytkonzentration zur Verfügung stand und ab der Verdünnung PL3 (1:8) die Analytkonzentration unter dem LLoQ

lag. Für IL-2 konnte keine Parallelität untersucht werden, da kein humanes EDTA-Plasma mit ausreichend hohem endogenem Analytlevel vorhanden war und der Einsatz von rekombinantem Material für die Bestimmung der Parallelität nicht möglich ist. Der jeweils erforderliche minimale Verdünnungsfaktor (engl.: Minimal Required Dilution, Abk.: MRD) zur Analyse von humanem EDTA-Plasma lag für IFN- $\gamma$  bei 2, für IL-10 bei 4, für IL-17 bei 2 und für PCT bei 2.

**Tabelle 36: Ergebnisse der Parallelitätsbestimmung**

„NQ“ = Nicht quantifizierbarer Wert, „<LLoQ“ = Konzentrationswert unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze, „NV“ = Nicht vorhanden (Probe war nicht vorgesehen), „WFR“ = Wiederfindungsrate.

Simoa-Assay		Parallelität					
		PL 1	PL 2	PL 3	PL 4	PL 5	PL 6
IFN- $\gamma$	Verdünnungsfaktor (1:x)	2	4	8	16		
	Assaykonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	2,24	0,951	0,443	0,203		
	Matrixkonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	4,47	3,80	3,54	3,25	NV	NV
	Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )		3,77				
	WFR (%)	119	101	94,1	86,4		
IL-10	Verdünnungsfaktor (1:x)	4	8	16	32	64	128
	Assaykonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,212	0,124	0,0672	0,0336	0,0151	0,00740
	Matrixkonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,849	0,995	1,08	1,08	0,969	0,947
	Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )			0,985			
	WFR (%)	86,2	101	109	109	98,3	96,2
IL-17	Verdünnungsfaktor (1:x)	2	4	8			
	Assaykonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,0731	0,0310	<LLoQ			
	Matrixkonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,146	0,124	NQ	NV	NV	NV
	Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )		0,132				
	WFR (%)	111	94,0	NQ			
PCT	Verdünnungsfaktor (1:x)	2	4	8	16	32	64
	Assaykonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	47,3	21,6	9,45	4,76	2,34	1.345
	Matrixkonz. (pg·mL <sup>-1</sup> )	94,7	86,6	75,6	76,2	74,8	86,0
	Referenzwert (pg·mL <sup>-1</sup> )			82,2			
	WFR (%)	115	105	91,9	92,6	90,9	105

#### 4.2.9 Bestimmung der Analytstabilität

Die Analytstabilität wurde bezogen auf die Lagertemperatur, Lagerzeit und die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen bestimmt. Hierfür wurden für jeden Simoa-Assay zehn Aliquots (AS1 – AS10) einer Probe mit mittlerer Analytkonzentration verwendet. Als Referenzprobe für die jeweiligen Analytstabilitätsproben diente ein unbehandeltes Aliquot (AS 1), welches direkt vor der Analyse bei RT aufgetaut wurde. Das festgelegte Akzeptanzkriterium war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 % bezogen auf die AS 1-Probe. Die Untersuchung der Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen zeigte, dass diese für alle Analyten für bis zu drei Zyklen gegeben war (Tabelle 37). Die bestimmten Wiederfindungsraten, bezogen auf AS 1, waren: IFN- $\gamma$ : 101 bis 107 %, IL-2: 86,4 bis 91,8 %, IL-10: 110 bis 117 %, IL-17: 101

bis 107 %, PCT: 97,1 bis 104 %. Damit lagen die Ergebnisse aller Analyten innerhalb des 80 bis 120 %-Akzeptanzbereiches (Tabelle 37).

**Tabelle 37: Untersuchung der Analytstabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen.**

Simoa-Assay		Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen			
		AS 1	AS 2	AS 3	AS 4
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Einfrier- und Auftauzyklen (n)	0	1	2	3
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	1,06	1,13	1,09	1,07
	WFR (%)	100	107	102	101
<b>IL-2</b>	Einfrier- und Auftauzyklen (n)	0	1	2	3
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	1,59	1,46	1,44	1,37
	WFR (%)	100	91,8	90,3	86,4
<b>IL-10</b>	Einfrier- und Auftauzyklen (n)	0	1	2	3
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	1,40	1,54	1,65	1,56
	WFR (%)	100	110	117	112
<b>IL-17</b>	Einfrier- und Auftauzyklen (n)	0	1	2	3
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	1,23	1,24	1,29	1,33
	WFR (%)	100	101	105	107
<b>PCT</b>	Einfrier- und Auftauzyklen (n)	0	1	2	3
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	138	143	134	138
	WFR (%)	100	104	97,1	99,9

Die Untersuchung der Kurzzeitstabilität ergab, dass diese bei 4 °C für alle Analyten bis zu 24 h gegeben war ( Tabelle 38). Die Wiederfindungsraten der untersuchten Kurzzeitstabilität bei 4 °C lagen für IFN- $\gamma$  bei 107 bis 111 %, für IL-2 bei 89,0 bis 101 %, für IL-10 bei 109 bis 116 %, bei IL-17 bei 83,4 bis 90,8 % und für PCT bei 83,1 bis 110 %. Damit lagen die Ergebnisse aller Analyten innerhalb des 80 bis 120 %-Akzeptanzbereiches ( Tabelle 38).

Die Ergebnisse der untersuchten Kurzzeitstabilität bei RT zeigten, dass eine Lagerung bei RT bis zu 24 h bei den Analyten IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 und PCT zu keiner Änderung der Analytkonzentration führte ( Tabelle 38). Die Wiederfindungsraten der untersuchten Kurzzeitstabilität bei RT lagen für IFN- $\gamma$  bei 102 bis 114 %, für IL-2 bei 94,8 bis 107 %, für IL-10 bei 114 bis 120 % und für PCT bei 89,2 bis 98,9 %.

Für IL-17 zeigte sich, dass die Analytstabilität bei RT nur für 2 und 4 h gegeben war. Für die 24 h RT-Probe sank die Analytkonzentration und die Wiederfindungsrate betrug nur noch 51,9 %. Für die Proben gelagert bei RT für 2 h und 4 h ergaben sich Wiederfindungsraten von 103 % und 86,4 % und erfüllten das Akzeptanzkriterium.

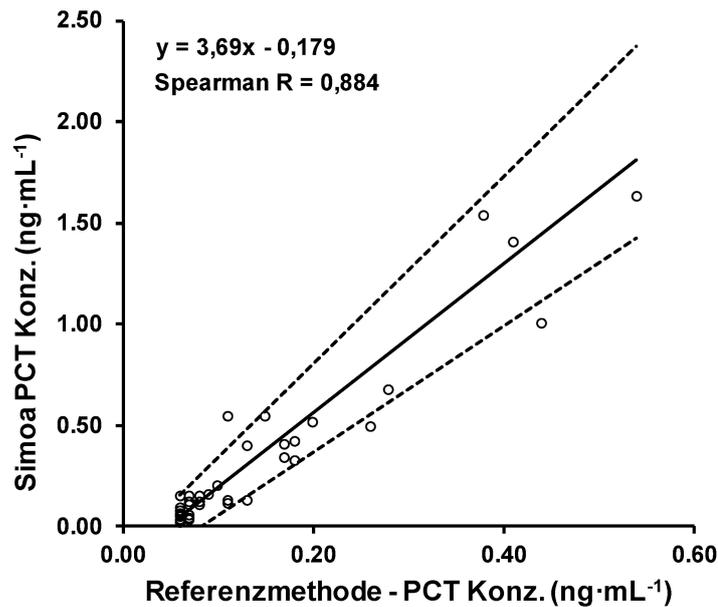
Tabelle 38: Untersuchung der Kurzzeitstabilität.

Simoa-Assay		Kurzzeitstabilität						
		AS 1	AS 5	AS 6	AS 7	AS 8	AS 9	AS 10
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Testtemperatur	NA	4 °C	4 °C	4 °C	RT	RT	RT
	Lagerzeit bei Testtemperatur (h)	NA	2	4	24	2	4	24
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	1,06	1,13	1,18	1,14	1,12	1,22	1,09
	WFR (%)	100	107	111	107	106	114	102
<b>IL-2</b>	Testtemperatur	NA	4 °C	4 °C	4 °C	RT	RT	RT
	Lagerzeit bei Testtemperatur (h)	NA	2	4	24	2	4	24
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	1,59	1,42	1,60	1,48	1,51	1,59	1,70
	WFR (%)	100	89,0	101	92,7	94,8	100	107
<b>IL-10</b>	Testtemperatur	NA	4 °C	4 °C	4 °C	RT	RT	RT
	Lagerzeit bei Testtemperatur (h)	NA	2	4	24	2	4	24
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	1,40	1,62	1,63	1,53	1,68	1,60	1,63
	WFR (%)	100	116	116	109	120	114	116
<b>IL-17</b>	Testtemperatur	NA	4 °C	4 °C	4 °C	RT	RT	RT
	Lagerzeit bei Testtemperatur (h)	NA	2	4	24	2	4	24
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	1,23	1,09	1,12	1,03	1,27	1,07	0,641
	WFR (%)	100	88,0	90,8	83,4	103	86,4	51,9
<b>PCT</b>	Testtemperatur	NA	4 °C	4 °C	4 °C	RT	RT	RT
	Lagerzeit bei Testtemperatur (h)	NA	2	4	24	2	4	24
	Matrixkonzentration (pg·mL <sup>-1</sup> )	138	115	145	138	137	128	123
	WFR (%)	100	83,1	105	110	98,9	92,2	89,2

#### 4.2.10 Korrelation des entwickelten PCT Simoa-Assays mit einem klinischen Analysegerät

Um die Richtigkeit des entwickelten PCT Simoa-Assays zu untersuchen, wurde ein Methodenvergleich mit dem klinischen B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assay (klinisches Analysegerät, [123]) durchgeführt. Die Analyse mit dem klinischen Analysegerät erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikum Tübingen.

Proben mit hoher, mittlerer und niedriger Analytkonzentration (gemessen mit PCT Simoa-Assay) wurden mit beiden Methoden analysiert. Um einen breiten Konzentrationsbereich abzudecken, wurden Patientenproben mit diagnostizierter viraler und bakterieller Infektion, als auch Proben von gesunden Spendern analysiert (siehe Kapitel 3.2.5.2). Die Validierung des PCT Simoa-Assays erfolgte für EDTA-Plasma als Probenmatrix. Um die Eignung des entwickelten Assays für die Analyse von humanem Serum und humaner Zerebrospinalflüssigkeit zu untersuchen, wurden diese beiden Probenarten für die Durchführung des Methodenvergleichs ebenfalls analysiert. Die Untersuchung und Bewertung der Korrelation der beiden Methoden erfolgte durch eine Passing-Bablok Regression (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Korrelationsdiagramm der Passing-Bablok Regressionsanalyse PCT Referenzmethode mit dem PCT Simoa-Assay.**

Als Referenzmethode diente der B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assay (klinisches Analysegerät). Darstellung der Regressionsgeraden als Referenzmethode-PCT-Konzentration gegen Simoa-PCT-Konzentration in  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $n = 42$ ). Bestimmt wurde die lineare Regressionsgleichung (durchgezogene Linie) der Passing-Bablok Regressionsanalyse mit 95 % Konfidenzintervallen (gestrichelte Linien), sowie den Korrelationskoeffizienten nach Spearman.

Für die Durchführung des Methodenvergleichs standen 81 humanen Proben (39 Serumproben und 42 Zerebrospinalflüssigkeitsproben) zur Verfügung. Mit dem PCT Simoa-Assay konnte für jede der 81 Proben die PCT-Konzentration bestimmt werden. Bei der Analyse mit dem B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assay konnte jedoch für 39 Proben keine PCT Konzentration ermittelt werden, da die Konzentrationen dieser Proben unterhalb des LLoQ-Wertes von  $0,06 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  des klinischen Analysegerätes lagen. Für die Untersuchung der Korrelation nach Passing-Bablok wurden die Ergebnisse der Analyse mit dem PCT Simoa-Assay dieser 39 Proben nicht miteingeschlossen, weswegen für die Bestimmung der Korrelation die Ergebnisse von 42 Proben verwendet wurden.

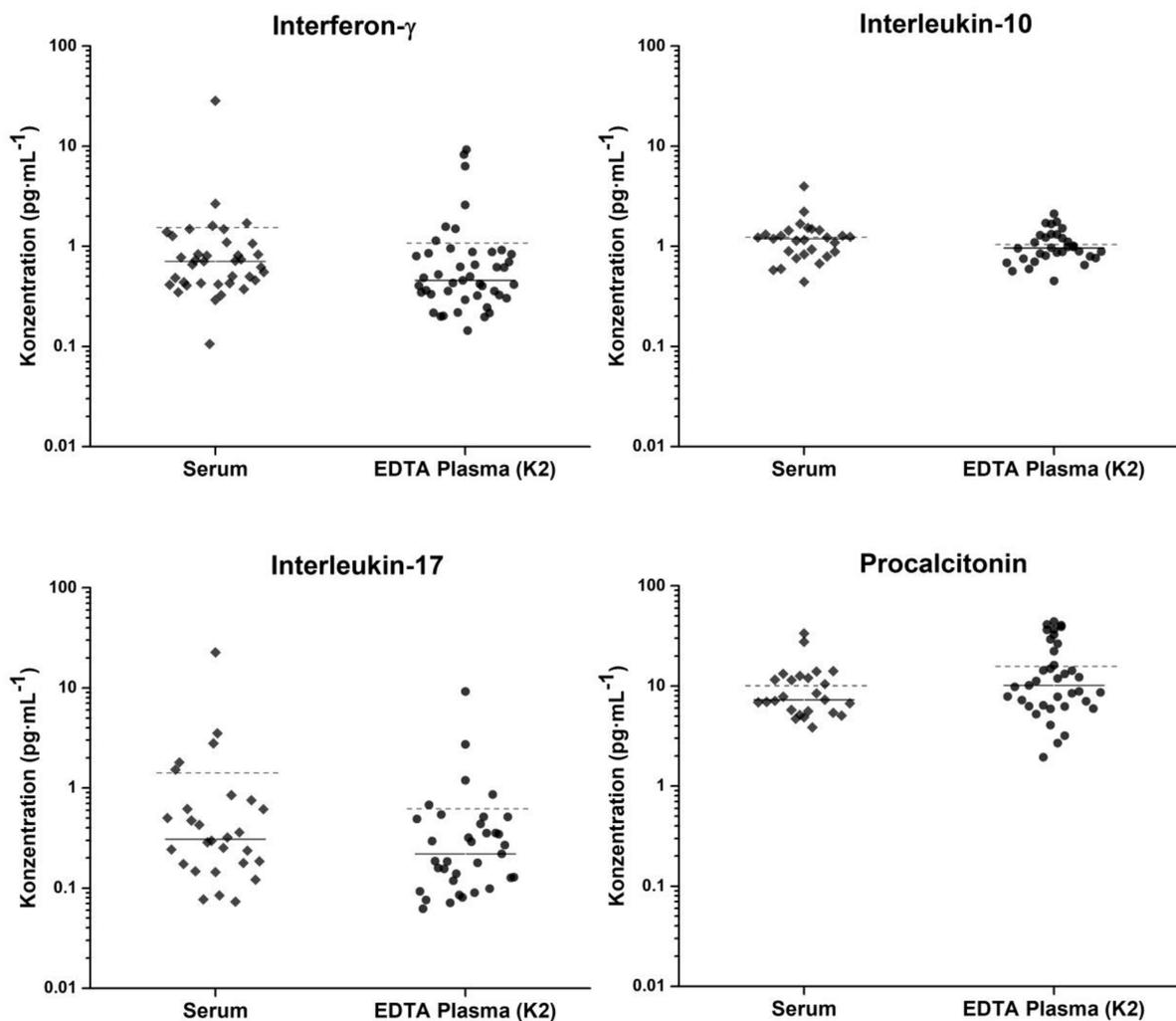
Die mit dem Simoa-Assay ermittelte PCT Konzentrationen der humanen Proben korrelierten positiv mit den Konzentrationsergebnissen des klinischen B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assays. Die Untersuchung des bivariaten Zusammenhangs ergab einen Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman von 0,884. Die Korrelation war auf dem Niveau von 0,05 signifikant (2-seitig). Die bestimmte Steigung der Regressionsgleichung nach Passing-Bablok war 3,69 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 3,11 bis 4,63. Der erhaltene y-Achsenabschnitt der Regressionsgleichung lag bei -0,179 mit einem 95%-Konfidenzintervall von -0,255 bis -0,125. Der 95 %-Intervallbereich des y-Achsenabschnittes schloss den Wert 0 nicht mit ein und der 95 %-Intervallbereich der Steigung schloss den Wert 1 nicht mit ein. Das

Nicht-Miteinschließen dieser Werte in die entsprechenden 95 %-Intervalle zeigte, dass die Konzentrationsunterschiede der beiden Methoden konstant (y-Achsenabschnitt) und proportional (Steigung) waren [117, 118]. Um die, mit dem PCT Simoa-Assay erhaltenen Messergebnisse an die Referenzmethode anzupassen, wurde eine Berichtigung des proportionalen Unterschiedes implementiert. Nach Rückrechnung, der mit dem Simoa-Assay bestimmten PCT Konzentrationen, wurden die Konzentrationswerte mit dem Steigungswert der Regressionsgleichung ( $a = 3,69$ ) dividiert. Eine Korrektur des konstanten Unterschiedes konnte aufgrund der fehlenden Messdaten im niedrigen Konzentrationsbereich nicht durchgeführt werden (siehe Kapitel 5.3.6), weswegen nur die beschriebene Korrektur des proportionalen Unterschiedes durchgeführt wurde. Für die anderen entwickelten Simoa-Assays war keine Referenz-Standardmethode verfügbar weswegen für diese keine dahingehenden Vergleiche angestellt werden konnten.

### 4.3 Quantifizierung der Konzentration von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-17 und PCT in Blutproben gesunder Spender

Mit Hilfe der entwickelten hochsensitiven Simoa-Assays sollten die Analytkonzentrationen in humanen Proben gesunder Spender ermittelt werden. Aufgrund der nicht ausreichenden Sensitivität der herkömmlich verwendeten Methoden für die Quantifizierung der IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-17 oder PCT Analytlevel sind Normwerte i. d. R. nicht bestimmbar [8, 13]. Für die Bestimmung eines Referenzbereiches der fünf Analyten wurden Serum- und EDTA-Plasmaproben (K2) gesunder Spender (Tabelle 26) mit den entwickelten Simoa-Assays analysiert. Die Bestimmung der Analytlevel erfolgte durch Analyse von 42 bis 49 Plasma- bzw. 41 bis 45 Serumproben. Für die analysierten humanen Blutproben gesunder Spender konnten (Abbildung 21), für die Analyten IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17 und PCT, in allen Proben Konzentrationen oberhalb der jeweiligen LLoQ-Werte der Simoa-Assays detektiert werden. Berechnet wurden der Mittelwert, der Median und der Interquartilsabstand (Abk.: IQA).

Für die Bestimmung der IFN- $\gamma$  Konzentrationsmittelwerte wurden die Ergebnisse von sieben Serum- und zwei Plasmaproben nicht in die Auswertung miteingeschlossen, da die berechneten Variationskoeffizienten der Duplikate größer waren als 30 %. Die Bestimmung der IFN- $\gamma$  Konzentration ergab einen Mittelwert von  $1,54 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  und einen Median von  $0,708 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (IQA =  $0,637 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) in Serum ( $n = 37$ ). Die IFN- $\gamma$  Bestimmung in Plasma ( $n = 45$ ) ergab einen Mittelwert von  $1,08 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  und einen Median von  $0,457 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (IQA =  $0,530 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Der IL-10 Konzentrationsmittelwert in Serum ( $n = 41$ ) betrug  $1,40 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Median =  $1,28 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , IQA =  $0,434 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), der in Plasma ( $n = 42$ )  $1,20 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Median =  $1,06 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , IQA =  $0,641 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Alle erhaltenen Ergebnisse der IL-10 Analyse waren valide und wurden in die Auswertung miteingeschlossen.



**Abbildung 21: Streudiagramme der Ergebnisse der Quantifizierung von IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17 und PCT in Proben gesunder Spender zur Bestimmung der jeweiligen Referenzwerte.**

Die Analyse der humanen Proben erfolgte in Duplikaten. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Duplikate, für Proben mit einem Variationskoeffizienten der Duplikate kleiner als 30 %. Die angegebenen Analytlevel sind die bestimmten Konzentrationen multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor. Die gestrichelten Linien entsprechen dem jeweiligen Mittelwert der Datensätze, die durchgezogene Linien entsprechen dem jeweiligen Median der Datensätze. Auf der y-Achse sind die Konzentrationen der Proben in  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  aufgetragen (logarithmische Skalierung).

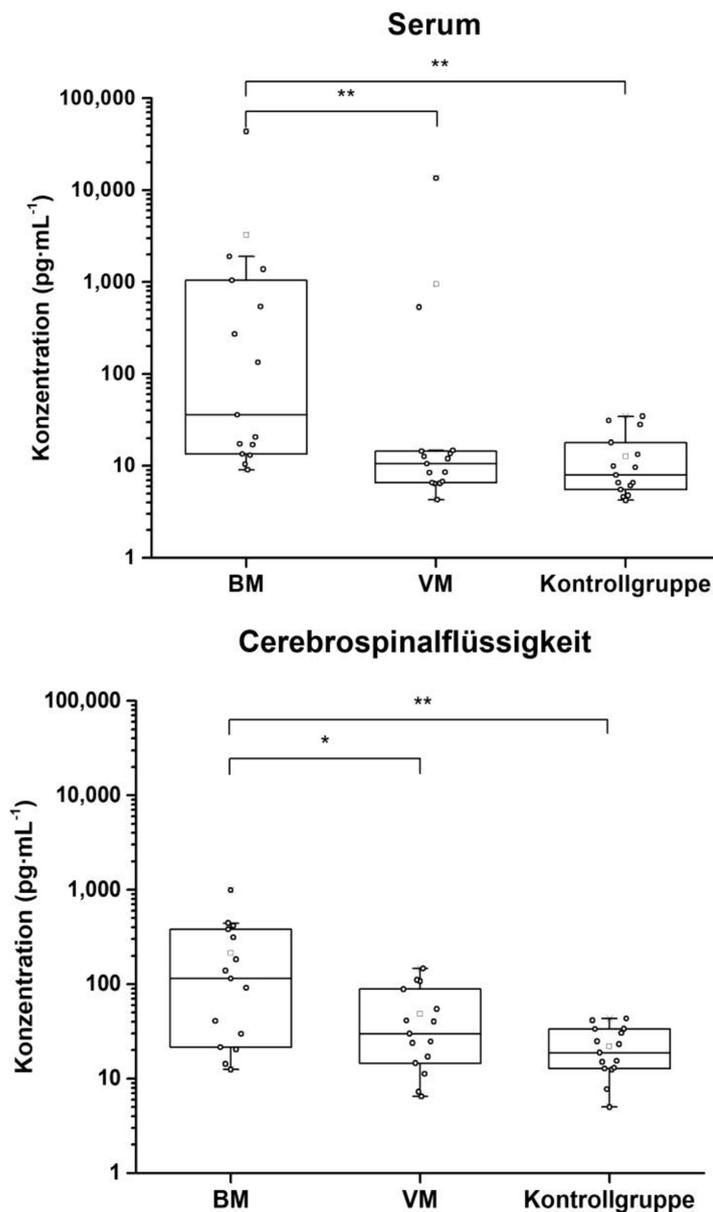
Der IL-17 Konzentrationsmittelwert in Serum ( $n = 42$ ) betrug  $1,13 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median =  $0,287 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , IQA =  $0,582 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), der in Plasma ( $n = 44$ )  $0,576 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median =  $0,281 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , IQA =  $0,377 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Das Ergebnis einer EDTA-Plasmaprobe für IL-17 wurde nicht in die Auswertung miteingeschlossen (Wert < LLoQ). Für die Auswertung der PCT Konzentrationsbestimmung wurden die Ergebnisse von vier Spendern von der Analyse ausgeschlossen. In den Proben dieser vier Spender (2-mal Serum- und 2-mal EDTA-Plasmaproben) wurden PCT Level oberhalb des allgemeingültigen Grenzwertes gesunder Spender von  $50,0 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  [123] detektiert. Solch erhöhte PCT Level können z. B. aufgrund einer noch nicht diagnostizierten Infektionskrankheit auftreten und wurden aus diesem Grund

aus der Analyse für die Bestimmung eines Normwertes gesunder Spender ausgenommen. Der PCT Konzentrationsmittelwert in Serum ( $n = 39$ ) betrug  $10,6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median =  $7,83 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , IQA =  $7,21 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), der in Plasma ( $n = 47$ )  $15,8 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median =  $10,6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , IQA =  $16,0 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Die Bestimmung valider IL-2 Konzentrationen war nur in fünf der insgesamt 85 Proben möglich. Bei allen analysierten Serumproben lag die IL-2 Konzentration unterhalb von  $0,117 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (LLoQ multipliziert mit Verdünnungsfaktor) und somit unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze des IL-2 Simoa-Assays. Bei den analysierten EDTA-Plasmaproben konnte für fünf Proben ein IL-2 Level bestimmt werden ( $0,126$ ,  $0,171$ ,  $0,171$ ,  $0,205$  und  $0,297 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Für die restlichen 39 EDTA-Plasmaproben lag die Analytkonzentration ebenfalls unterhalb von  $0,117 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### **4.4 Bestimmung von PCT in Patientenproben mit diagnostizierter Meningitis**

Mit dem entwickelten PCT Simoa-Assay wurden sowohl Patientenproben mit diagnostizierter bakterieller (BM,  $n = 15$ ) und viraler Meningitis (VM,  $n = 15$ ), als auch Vergleichsproben (Kontrollgruppe,  $n = 15$ ) von Patienten ohne diagnostizierter Meningitis (siehe Kapitel 3.2.5.2), analysiert. Es sollte untersucht werden, ob die Bestimmung der PCT Konzentration bis in den niedrigen  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , welche durch den Einsatz eines hochsensitiven Simoa-Immunoassays zur Messung von PCT möglich wurde, die diagnostische Aussagekraft von PCT steigern kann und die Diagnose einer viralen Meningitis ermöglicht. Mit Hilfe einer statistischen Auswertung der Messergebnisse wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen vorliegen. Durchgeführt wurden 2-seitige Signifikanztests nach Mann, Whitney und Wilcoxon (Normalverteilung zurückgewiesen nach Shapiro-Wilk) mit einem Signifikanzniveau von 5,0 %, entsprechend einem p-Wert von 0,05 (Nullhypothese:  $F(x) = G(y)$ , Alternativhypothese:  $F(x) \neq G(y)$ ). Für alle analysierten humanen Proben lag die PCT Konzentration, innerhalb der Bestimmungsgrenzen des entwickelten Simoa-Immunoassays. Die PCT Konzentration der BM-Gruppe resultierte in höheren Konzentrationen im Vergleich zu der VM- und der Kontrollgruppe (Abbildung 22). Der Mittelwert der PCT Konzentration in Serum von Patienten mit diagnostizierter BM war  $3261 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , der Median betrug  $35,8 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $1032 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). In CSF lag der Mittelwert dieser Gruppe bei  $214 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median =  $115 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , IQA =  $359 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).



**Abbildung 22: Box-Whisker-Plots mit Datenüberschneidung für die Ergebnisse der Quantifizierung von PCT in Patientenproben mit diagnostizierter bakterieller und viraler Meningitis und in einer Kontrollgruppe.**

Darstellung der Ergebnisse in Box-Whisker-Plots mit Medianlinie, 25- und 75 %-Perzentile und 1,5·IQA Fehlerbalken. Die dargestellten Kreise entsprechen den bestimmten Konzentrationen der analysierten Proben, die dargestellten Quadrate entsprechen dem jeweiligen Mittelwert. Analyse der humanen Proben erfolgte in Duplikaten. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Duplikate, wenn der Variationskoeffizient der Duplikatmessungen kleiner war als 30 %. Aufgetragen sind die Konzentrationen der Proben in  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (logarithmische Skalierung). Die PCT Konzentration wurde in Serum (oben) und CSF (unten) bestimmt. „BM“ = Bakterielle Meningitis, „VM“ = Virale Meningitis;

\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$

Die aufgetretenen starken Verschiebungen des Mittelwertes zu einer deutlich erhöhten PCT Konzentration im Vergleich zum berechneten Median (Ausreißer gemäß Kapitel 3.2.6.8) sind auf einen einzelnen Messwert (für Serum) bzw. auf zwei Messwerte (für CSF) zurückzuführen. Der PCT Konzentrationsmittelwert der Patienten mit VM betrug in Serum  $946 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median =  $10,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , IQA =  $7,89 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und in CSF  $48,3 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median =  $29,9 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , IQA =  $73,9 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Im Vergleich dazu lag der PCT Konzentrationsmittelwert der Kontrollgruppe in Serum bei  $12,7 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median =  $7,90$ , IQA =  $12,5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und in CSF bei  $22,0 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median =  $18,8$ , IQA =  $20,7 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Die Mann-Whitney-Signifikanzanalyse der Ergebnisse in Serum ergab einen p-Wert von 0,004 für die Untersuchung der Unterschiede zwischen der BM- und der VM-Gruppe und einen p-

Wert von 0,001 zwischen der BM- und der Kontrollgruppe. Demnach lagen signifikante Unterschiede zu den Konzentrationen der VM- und der Kontrollgruppe vor. Zwischen der VM- und der Kontrollgruppe konnte bei einem Niveau vom 5,0 % kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p = 0,407$ ). Die Mann-Whitney-Signifikanzanalyse der Ergebnisse in CSF ergab, dass sich die PCT Konzentration der BM-Gruppe signifikant von der PCT Konzentration der VM- ( $p = 0,042$ ) und der Kontrollgruppe ( $p = 0,004$ ) unterschied. Zwischen der VM- und der Kontrollgruppe konnte auch in CSF kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p = 0,184$ ). Demnach konnten in beiden Probenarten die BM-Patienten von den VM-Patienten und der Kontrollgruppe unterschieden werden, jedoch zeigten sich keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen anderen Patientengruppen.

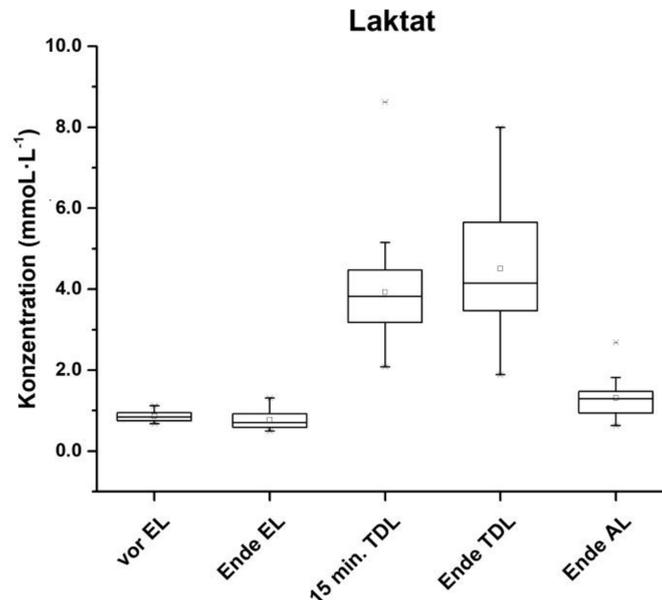
#### **4.5 Quantifizierung der Analytkonzentration IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-17 und PCT in Blutproben ausdauertrainierter Probanden**

Für die mögliche Charakterisierung neuer Biomarker und Indikatoren des Trainings- und Belastungsprozesses bei Sportlern wurden Plasmaproben von 21 gesunden männlichen ausdauertrainierten Probanden vor und nach einer Akutbelastung mit den entwickelten Simoa-Assays analysiert (siehe Kapitel 0). Die Probenentnahme, der in dieser Arbeit analysierten Proben, erfolgte dabei vor der Einlaufphase (in Ruhe), 30 Minuten nach dem Tempodauerlauf und zwei Stunden nach dem Tempodauerlauf.

Für die Kontrolle der Belastungsintensität wurde u. a. die Laktatkonzentration der Probanden an fünf Zeitpunkt vor und nach der Belastung bestimmt (Abbildung 23). Die Ausdauerleistungsfähigkeit der Probanden sollte bei einem Tempodauerlauf mit 105 % IAS (individuelle anaerobe Schwelle, siehe Kapitel 0) im Bereich der aeroben/anaeroben Schwelle (Laktatkonzentration ca. 3,5 bis 4,0 mmol·L<sup>-1</sup> [124]; reiner Richtwert) liegen. Die Ermittlung der Laktatkonzentration erfolgte durch das Universitätsklinikum Tübingen (Abteilung Sportmedizin).

Die Ergebnisse der Laktatkonzentrationsbestimmung (Abbildung 23) zeigten eine Zunahme der Laktatkonzentration im Blut während des Tempodauerlaufes (15 Minuten nach Beginn) und direkt nach dem Tempodauerlauf. Die Laktatkonzentration stieg 15 Minuten nach Beginn des Tempodauerlaufes auf eine Median-Konzentration von 3,82 mmol·L<sup>-1</sup> (IQA: 1,29 mmol·L<sup>-1</sup>) und war um den Faktor 4,5 höher als vor der Belastung mit einer Median-Konzentration von 0,840 mmol·L<sup>-1</sup> (IQA: 0,200 mmol·L<sup>-1</sup>). Während der nächsten 15 Minuten Belastung stieg die Laktatkonzentration erneut an und erreichte nach dem Ende des Tempodauerlaufes eine Median-Konzentration von 4,15 mmol·L<sup>-1</sup> (IQA: 2,18 mmol·L<sup>-1</sup>) und war um den Faktor 4,9 höher als vor der Belastung. Im Anschluss an den Tempodauerlauf erfolgte eine 15-minütige Auslaufphase. Nach Beendigung der Auslaufphase sank der Median der Laktatkonzentration auf 1,29 mmol·L<sup>-1</sup> (IQA: 0,530 mmol·L<sup>-1</sup>) und war nur noch um den

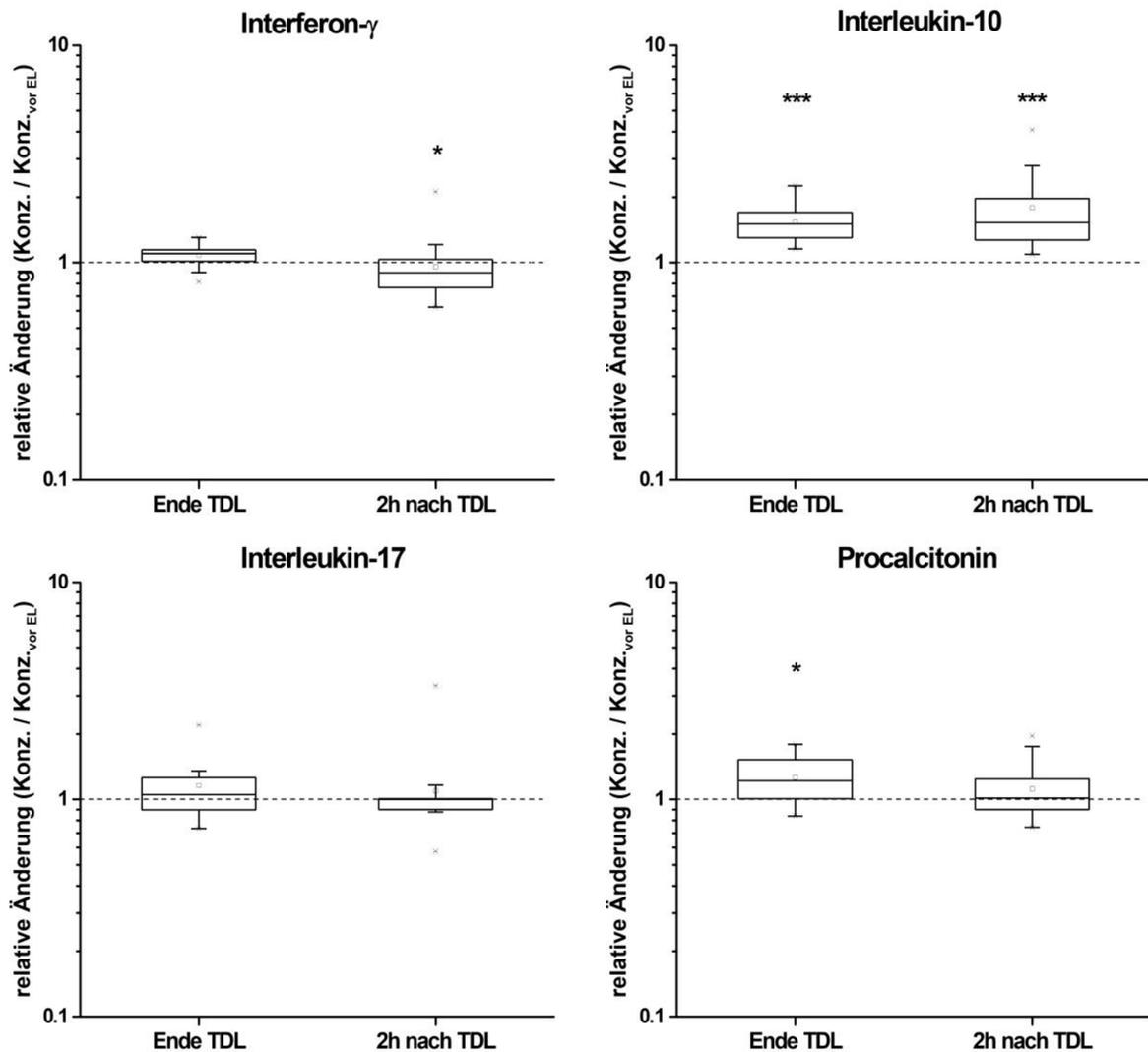
Faktor 1,5 höher als vor der Belastung. Der Verlauf der Laktatkonzentrationen zeigte, dass die vorgesehene Belastungsintensität erreicht wurde und die Ausdauerleistung der Probanden im Bereich der aeroben/anaeroben Schwelle lag.



**Abbildung 23: Box-Plot-Diagramme der Laktatkonzentrationen der Probanden an fünf Zeitpunkten vor und nach der Belastung zur Leistungsüberprüfung.**

Darstellung der Ergebnisse in Box-Whisker-Plots mit Medianlinie, 25 %- und 75 %-Perzentile und 1,5· IQA-Fehlerbalken. Die dargestellten Quadrate entsprechen dem jeweiligen Mittelwert des Datensatzes. Auf der y-Achse sind die Konzentrationen der Proben in  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  aufgetragen. „EL“ = Einlaufphase, „TDL“ = Tempodauerlauf, „AL“ = Auslaufphase

Mit Hilfe einer statistischen Auswertung der Simoa-Messergebnisse wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den drei Abnahmezeitpunkten vorlagen und somit ggf. neue Indikatoren des Trainings- und Belastungsprozesses identifiziert werden können. Durchgeführt wurden 2-seitige Signifikanztests nach Wilcoxon (verbundene Stichproben; Normalverteilung zurückgewiesen nach Shapiro-Wilk) mit einem Signifikanzniveau von 5,0 %, entsprechend einem p-Wert von 0,05 (Nullhypothese:  $F(x) = G(y)$ , Alternativhypothese:  $F(x) \neq G(y)$ ). Für die grafische Darstellung der Ergebnisse anhand von Box-Whisker-Plots (Abbildung 24) wurden die relativen Änderungen der Analytlevel vor und nach der Belastung bestimmt und aufgetragen. Hierfür wurden die Analytlevel direkt nach dem Tempodauerlauf (Ende TDL) und zwei Stunden nach dem Tempodauerlauf (2 h nach TDL) durch die Analytkonzentration vor der Einlaufphase (vor EL) dividiert. Die Box-Whisker-Plots (Abbildung 24) zeigten für die Analyten IFN- $\gamma$ , IL-10 und PCT relative Konzentrationsänderungen zwischen dem Zeitpunkt vor der Einlaufphase, dem Zeitpunkt direkt nach dem Tempodauerlauf und dem Zeitpunkt zwei Stunden nach dem Tempodauerlauf, da sie oberhalb bzw. unterhalb der Markierung für den Wert eins lagen (gestrichelte Linie).



**Abbildung 24: Box-Whisker-Plots für die Ergebnisse der Quantifizierung von IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17 und PCT vor und nach sportlicher Belastung bei 105 % IAS.**

Darstellung der Ergebnisse in Box-Whisker-Plots mit Medianlinie, 25 %- und 75 %-Perzentile und 1,5-IQA-Fehlerbalken. Analyse der humanen Proben erfolgte in Duplikaten. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte der Duplikate (%CV < 30). Aufgetragen sind die relativen Konzentrationsänderungen bezogen auf die Analytkonzentration vor Belastung (vor EL) (logarithmische Skalierung). Gestrichelte Linie = 1 (entspricht keiner Änderung bezogen auf die Analytkonzentration vor Belastung). \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  (Signifikanzunterschiede zu Level vor Belastung).

Für den Analyten IL-17 zeigten sich keine relativen Änderungen zwischen den drei untersuchten Belastungsphasen, da die Plots direkt an der gestrichelten Linie (Wert = 1) lagen. Die IL-10 und PCT Konzentrationen konnten in 100 % der analysierten 63 humanen Blutproben der 21 Probanden quantifiziert werden. Die IFN- $\gamma$  Konzentration konnte in 94 % der analysierten Blutproben quantifiziert werden und die IL-17 Konzentration in 70 % der Proben. Die IL-2 Konzentration konnte nur in 8 % der analysierten Proben quantifiziert werden, in den weiteren Proben lag die IL-2 Konzentration unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze von  $0,116 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  des entwickelten IL-2 Simoa-Assays. Aufgrund der wenigen Proben ( $n = 5$ ) in denen die IL-2 Konzentration bestimmt werden konnte, wurden keine grafische und keine statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt.

Der Median der IFN- $\gamma$  Konzentration lag für die Proben entnommen vor der Einlaufphase bei  $0,311 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $0,342 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Mittelwert =  $0,518$ ), nach Ende des Tempodauerlaufs bei  $0,330 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $0,425 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Mittelwert =  $0,541 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und 2 h nach dem Tempodauerlauf bei  $0,295 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $0,386 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Mittelwert =  $0,466 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Ausgehend von dem Median der IFN- $\gamma$  Konzentration vor der Einlaufphase stieg der Median der Konzentration nach dem Tempodauerlauf an und sank 2 h nach dem Tempodauerlauf auf ein IFN- $\gamma$  Level unterhalb der Konzentration vor der Belastung. Die Signifikanzanalyse nach Wilcoxon zeigte keinen signifikanten Unterschied der IFN- $\gamma$  Konzentration vor der Einlaufphase und direkt nach dem Tempodauerlauf. Die IFN- $\gamma$  Konzentration 2 h nach dem Tempodauerlauf war signifikant niedriger als die Konzentration vor der Einlaufphase ( $p = 0,0349$ ). Der Median der IL-10 Konzentration der Probanden lag für die Proben entnommen vor der Einlaufphase bei  $4,66 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $2,11 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Mittelwert =  $6,25 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Nach dem Tempodauerlauf stieg das IL-10 Level signifikant an ( $p < 0,0001$ ) und erreichte einen Median von  $7,42 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $2,46 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). 2 h nach dem TDL lag die Median-Konzentration bei  $7,97 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $5,38 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Mittelwert =  $9,11 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und war signifikant höher als die Konzentration vor der Einlaufphase ( $p < 0,0001$ ), aber mit einem  $p$ -Wert von  $0,198$  nicht signifikant höher als die Analytkonzentration direkt nach TDL ( $p$ -Wert nicht in Abbildung 24 dargestellt). Der Median der IL-17 Konzentration ( $n = 17$ ) lag vor der Einlaufphase bei  $0,135 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $0,145 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Mittelwert =  $0,360 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und war nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,185$ ) von der IL-17 Konzentration direkt bzw. 2 h nach dem Tempodauerlauf ( $p = 0,295$ ). Der Median der PCT Konzentration der Probanden ( $n = 21$ ) lag für die Proben entnommen vor der Einlaufphase bei  $107 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $156 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Mittelwert =  $303 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), nach Ende des Tempodauerlaufs bei  $112 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $156 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Mittelwert =  $310 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und 2 h nach dem Tempodauerlauf bei  $107 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (IQA =  $122 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Mittelwert =  $287 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Ausgehend von dem Median der PCT Konzentration vor der Einlaufphase stieg die Konzentration nach dem Tempodauerlauf signifikant an ( $p = 0,0263$ ) und sank 2 h nach TDL wieder auf ein Niveau im Bereich der Konzentration vor der Belastung (kein signifikanter Unterschied,  $p = 0,588$ ).

## 5 Diskussion

Diese Arbeit befasste sich mit der Entwicklung und Validierung von hochsensitiven Immunoassays, mit denen Basiswerte in Blutproben gesunder Spender ermittelt werden konnten. Weiterhin wurden Patientenproben mit diagnostizierter Meningitis sowie Blutproben ausdauertrainierter Probanden analysiert. Im Folgenden wird die Entwicklung der hochsensitiven Immunoassays diskutiert und die Validierungsergebnisse bewertet. Anschließend werden die Ergebnisse der Blutproben im Kontext der wissenschaftlichen Fragestellungen diskutiert.

### 5.1 Hochsensitive Immunoassay-Plattformen

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden Immunoassays stetig weiterentwickelt unter anderem mit dem Ziel, die Sensitivität und den Durchsatz zu steigern. Verbesserte Assaysensitivitäten beruhen dabei beispielsweise auf der Einführung von Immunoassays mit Elektrochemilumineszenz (Abk.: ECL), Tyramid-Amplifikation, Chemilumineszenz oder zeitaufgelöster Fluoreszenz (Abk.: TRF). Diese konventionellen Technologien sind jedoch oft nicht in der Lage, Biomarker in niedrigsten Konzentrationsbereichen (niedriger  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ -Bereich oder niedriger) in biologischen Proben nachzuweisen, da auch die verbesserten Ansätze zur Sensitivitätssteigerung nicht ausreichend waren [8, 65]. Eine Messung von Analyten im subfemtomolaren Konzentrationsbereich ist jedoch im Hinblick auf die Erfassung des basalen Levels vieler potenzieller Biomarker von großem Interesse. Die weiterhin zum Teil fehlende Sensitivität führte in den vergangenen Jahren zur Entwicklung von Immunoassay-Technologien mit gesteigerten Sensitivitäten bis in den sub- $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ -Konzentrationsbereich, wie der SMC-, der Imperacer- oder der Simoa-Technologie. Hierbei besteht die größte Vergleichbarkeit des angewendeten Detektionssystems zu den konventionellen Assays bei der SMC- und der Simoa-Plattform. Diese Technologien sind aufgrund der Ausleseweise nach der Assaydurchführung in der Lage Einzelmoleküle zu detektieren, was zu einer teilweise drastischen Verbesserung der Assaysensitivitäten im Vergleich zu den zuvor erwähnten konventionellen Assay-Plattformen geführt hat [8, 16, 20, 21, 65]. Selbst durchgeführte Vergleiche dieser beiden Technologien zeigten, dass unter Verwendung der gleichen Assayreagenzien, vergleichbare Sensitivitäten erreicht werden konnten (Ergebnisse nicht in dieser Arbeit dargestellt). Deutliche Unterschiede gab es jedoch in der Handhabbarkeit der Assaydurchführung. Bei der Simoa-Technologie, durchgeführt in einem Analysegerät [14], handelt es sich um einen semiautomatisierten Prozess. Vorbereitet werden müssen die Reagenzien und die zu analysierenden Proben, wohingegen die Durchführung und das Auslesen durch das Analysegerät erfolgt (manuelle Arbeitszeit: ca. 1-2 h pro 96 Datenpunkte, eigener Erfahrungswert). Anders verhält es sich bei der SMC-Technologie. Hier erfolgt die Assaydurchführung händisch und nur die Auslese erfolgt im SMC-Messgerät. Die

Durchführung besteht aus mehreren Schritten, unter anderem aus mehreren Übertragungen der gesamten Proben auf neue Mikrotiterplatten inkl. eines Übertrags von einer 96-Kavitäten- zu einer 384-Kavitäten-Platte, aus der die finale Messung erfolgt. Diese zahlreichen Bearbeitungsschritte haben eine hohe manuelle Arbeitszeit zur Folge (ca. 3-4 h pro 96-Datenpunkte, eigener Erfahrungswert) und beinhalten zahlreiche potenzielle Fehlerquellen. Zum sicheren Umgang mit der SMC-Technologie wird demnach viel Erfahrung benötigt, um die in der Literatur beschriebene Präzision zu erreichen. Die deutlich einfachere Handhabbarkeit von Simoa-Assays ist dahingegen weniger fehleranfällig und vereinfacht daher auch das Transferieren der Simoa-Assays zu anderen Laboren. Aufgrund dieser Vorteile und der besseren Handhabbarkeit wurden für diese Arbeit hochsensitive Assays auf der Simoa-Plattform entwickelt.

## **5.2 Entwicklung und Optimierung der Simoa-Immunoassays**

Die Qualität von Immunoassays ist abhängig von vielen verschiedenen Faktoren. Während der Entwicklungsphase von Immunoassays ist es daher notwendig, verschiedenste Parameter zu optimieren, um einen möglichst spezifischen, präzisen und sensitiven Immunoassay zu erhalten. Hierfür wurden zur Entwicklung der hochsensitiven Simoa-Immunoassays sowohl geeignete Antikörperpaare als auch ein geeignetes Assayformat ermittelt. Anschließend wurden die Pufferzusammensetzungen und die Reagenzienkonzentration des Detektionssystems optimiert.

### **5.2.1 Identifikation geeigneter Antikörperpaare**

Für die Entwicklung von Immunoassays ist, wie oben beschrieben, die Wahl geeigneter Antikörperpaare von großer Bedeutung.

Für die Entwicklung von jedem der fünf Immunoassays wurden bis zu neun verschiedene Kombinationen an Antikörperpaaren (dargestellt in Abbildung 7) auf ihre Tauglichkeit und Sensitivität im Assay hin untersucht. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um kommerziell erhältliche monoklonale, als auch polyklonale Antikörper (Tabelle 3 und Tabelle 4). Nach Herstellung der Assayreagenzien wurden diese in einem ersten Ansatz (Kalibriergeraden) getestet und die Eignung evaluiert. Für die erste Beurteilung und den Vergleich von Kalibriergeraden, bezogen auf die Sensitivität, wurde vor allem das Signal-Rausch-Verhältnis (Abk.: S/N-Verhältnis) im niedrigen Konzentrationsbereich bewertet. Höhere S/N-Verhältnisse deuteten hierbei eine mögliche höhere Sensitivität und auch eine größere Steigung der Kalibriergeraden im niedrigen Konzentrationsbereich an. Größere Steigungen erhöhen die Präzision, da die Rückrechnung der Konzentrationswerte zuverlässiger ist. Verlaufen Kalibriergeraden flach (häufiger im niedrigen Konzentrationsbereich der Fall) können eigentlich eng beieinanderliegende Rohsignale weit

auseinanderliegende zurückgerechnete Konzentrationen ergeben. Dies ergibt im Assay eine entsprechend schlechtere Präzision und Richtigkeit (engl.: accuracy).

Es konnte für alle fünf Analyten passende Antikörperpaare identifiziert werden (Tabelle 15), die sowohl hohe Signale bei niedrigen Hintergrundsignalen sowie gute Kurvenverläufe aufwiesen. Mit diesen finalen Antikörperkombinationen wurden die weiteren Versuche zur Assayoptimierung durchgeführt.

Für die Entwicklung des IFN- $\gamma$  Immunoassays wurden sechs Antikörperpaarkombinationen untersucht. Hierbei zeigte die beste Kombination (FA1 x DA2) ein um den Faktor 1,4 höheres S/N-Verhältnis bei der niedrigsten getesteten Analytkonzentration von  $0,032 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , im Vergleich zur zweitbesten Kombination, auf. Für die Entwicklung des IL-2 Immunoassays wurden fünf Antikörperpaarkombinationen getestet, von welchen die Kombination FA3 x DA1 das beste S/N-Verhältnisse (Faktor 2,0) zeigte. Für die Etablierung des IL-10 und des IL-17 Immunoassays wurden jeweils neun Antikörperkombinationen getestet. Die beste IL-10 Antikörperkombination (FA1 x DA2) wies ein um den Faktor 1,8 höheres S/N-Verhältnis, im Vergleich zur zweitbesten Kombination, auf. Während der Testung aller vorhandenen IL-17 Antikörperkombinationen zeigte sich, dass für zwei Kombinationen (FA2 x DA1 und FA2 x DA2) vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Kombination FA2 x DA1 zeigte sehr ähnliche Ergebnisse und Versuche zur Assayoptimierung wurden auch mit dieser Kombination durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nicht dargestellt, da diese weiterhin sehr vergleichbar blieben, sich aber kontinuierlich leicht zu schlechteren Ergebnissen verschoben. Aus diesem Grund wurde für den finalen IL-17 Assay die Antikörperkombination FA2 x DA1 eingesetzt. Für die Entwicklung eines PCT Simoa-Assays wurden zwei monoklonale Antikörper verwendet. Diese Antikörper wurden als Antikörperpaar in einem Immunoassay (ELISA) mit hoher Affinität zu Procalcitonin und keiner Kreuzreaktivität zu Calcitonin und Katalcalcin beschrieben [122]. Der Antikörper 1 (Klone 4A6) ist gegen die PCT-Propeptid Sequenz gerichtet. Der zweite Antikörper (Klon 2F3) ist gegen die Calcitonin Sequenz gerichtet [122]. Aufgrund der höheren Spezifität für Procalcitonin des Antikörper 1 (Klon 4A6) wurde, bei ähnlicher Sensitivität zur Optimierung des initialen Assays, dieser Antikörper als Fängerantikörper verwendet und der Klon 2F3 als Detektionsantikörper.

### 5.2.2 Assayoptimierung

Ein wichtiger Parameter für die Optimierung von Simoa-Immunoassays ist die Wahl des Assayprotokolls. In dieser Arbeit wurden 2-Schritt- und 3-Schrittassayformate getestet und verglichen. Liegt ein 2-Schrittassayformat vor, werden in einem ersten Schritt die Fängerantikörper-Mikrosphären mit der Probe und dem biotinylierten Detektionsantikörper inkubiert und in einem zweiten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem Streptavidin- $\beta$ -galactosidase-Konjugat. Während eines 3-Schrittassayformates erfolgen die Inkubationen der

Probe mit den Fängerantikörper-Mikrosphären und dem Detektionsantikörper getrennt in zwei Schritten und in einem dritten Schritt die Inkubation mit SBG. Nach der Inkubation mit SBG erfolgt in beiden Assayformaten die Zugabe des Enzymsubstrates. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Kalibriergeraden und der höchsten erreichten Sensitivität.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Optimierung der Pufferzusammensetzung der Assays. Festphasen-Immunoassays beinhalten die Immobilisierung von Biomolekülen an eine feste Oberfläche, im Fall von Simoa-Assays an Mikrosphären. Solche Festphasen können jedoch dazu führen, dass unspezifische Bindung anderer Proteine oder Biomoleküle an unbesetzte Stellen auf der Oberfläche der Mikrosphären während der nachfolgenden Schritte des Assays die Spezifität und Empfindlichkeit der Assay-Ergebnisse beeinträchtigen. Die unspezifische Bindung an die Oberfläche kann minimiert werden, indem diese unbesetzten Bindungsstellen mit Blockierungsreagenz gesättigt werden, weswegen im Zuge einer Assayentwicklung eine Optimierung der Pufferzusammensetzung durchgeführt werden sollte. Hierbei sind Blockierungsreagenzien und -methoden in der Regel empirisch auszuwählen, da es kein standardisiertes Verfahren gibt, welches für alle Anwendungen, Analyten und Antikörper gleichermaßen geeignet ist. Als Blockierungsreagenz können proteinhaltige Lösungen oder Detergenzien eingesetzt werden. Proteinblocker können hier neben der Blockierung nicht besetzter Stellen an der festen Oberfläche auch die an die Oberfläche gebundenen Biomoleküle stabilisieren und sterische Hinderungen reduzieren. Bovines Serumalbumin (Abk.: BSA) ist ein weitverbreitetes, preiswertes Blockierungsreagenz, erzielt aber oft nicht die besten Ergebnisse (auch in dieser Arbeit zu sehen). Serum oder Plasma hingegen sind, aufgrund der natürlichen molekularen Vielfalt, gute Blockierungsreagenzien und blockieren wirksam Biomolekül-Oberflächen-Wechselwirkungen und unspezifische Protein-Protein-Interaktionen [125, 126]. Für die Optimierung der Pufferzusammensetzung der Simoa-Assays wurden Plasmaproben von verschiedenen Tieren in verschiedenen Konzentrationen getestet und die Ergebnisse anhand der Kalibriergeraden und der Analyse von humanen Plasmaproben bewertet.

In einem weiteren Schritt wurde die Konzentrationen der Assayreagenzien optimiert und es wurde getestet mit welchen Konzentrationen der einzelnen Assaykomponenten die Sensitivität und Performance der Assays gesteigert werden konnten. Hierbei sollte die minimalste mögliche Konzentration gefunden werden, mit welcher die besten Ergebnisse erzielt werden können, aber gleichzeitig auch an Reagenzien gespart werden kann, um die Kosten zu reduzieren. In dieser Arbeit wurden die jeweiligen Konzentrationen an Detektionsantikörper und Streptavidin- $\beta$ -galaktosidase optimiert. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Kalibriergeraden und der höchsten erreichten Sensitivität, die als primäres Ziel der zu entwickelnden Immunoassays galt.

Die Ermittlung eines geeigneten Assayprotokolls zeigte, dass die Simoa-Assays für IFN- $\gamma$ ,

IL-17 und PCT eine höhere Sensitivität bzw. einen besseren Kurvenverlauf bei der Durchführung eines 3-Schrittprotokolls erreichten. Für IL-10 und IL-2 wurde eine höhere Sensitivität durch ein 2-Schrittassayformat erzielt (Tabelle 16). Die Optimierung der Pufferzusammensetzung zeigte, dass drei unterschiedliche Puffer für die fünf entwickelten Simoa-Assays benötigt werden. Die Simoa-Assays IFN- $\gamma$  und IL-2 und IL-10 und IL-17 benötigten jeweils denselben Puffer (Tabelle 18). Die Puffer dieser vier Assays erreichten durch den Zusatz von tierischem EDTA-Plasma (EDTA-Plasma von der Kuh bzw. vom Schwein) die besten Ergebnisse bezüglich der Assaysensitivität. Für den PCT Assay wurden die besten Ergebnisse mit einem BSA-basierten Puffer erzielt (Tabelle 18). Durch die Optimierung der Konzentration der Assayreagenzien konnte für jeden Assay eine geeignete Detektionsantikörper- und Streptavidin- $\beta$ -galaktosidaskonzentration ermittelt werden (Tabelle 16).

Die Simoa-Immunoassayplattform bietet die Möglichkeit multiplexe Assays aufzusetzen. Dies geschieht durch den Einsatz von unterschiedlichen Mikrosphären, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und so bei der Auslese durch das Gerät unterschieden werden können [17, 127, 128]. Multiplexe Immunoassays ermöglichen den Nachweis mehrerer Analyten, was sowohl Zeit als auch wertvolles Probenmaterial spart [129, 130].

Die Ergebnisse der Assayentwicklung und Optimierung zeigten jedoch, dass die Entwicklung von multiplexen Assays häufig mit einem Verlust an Sensitivität einhergeht. In einem multiplexen Assay müssten für alle Analyten in diesem Multiplex dasselbe Assayformat und derselbe Puffer eingesetzt werden. Dies war ohne Eingang eines Kompromisses, bezüglich der optimalen Leistung der entwickelten Assays, nicht möglich. Zwar wurde zum Beispiel für die Analyten IL-10 und IL-2 eine höhere Sensitivität durch ein 2-Schrittassayformat erzielt, jedoch benötigen die beiden Analyten für eine optimale Assayperformance unterschiedliche Puffer, was es wiederum nicht möglich machte diese beiden Analyten in einem Assay zusammenzufassen.

Da das primäre Ziel dieser Arbeit darin bestand möglichst hochsensitive Assays für die einzelnen Analyten zu entwickeln, wurden alle als Einzelplex-Assays (engl.: singleplex) entwickelt, da nur hier die optimale Assayperformance erreicht werden konnte. Anschließend erfolgte die Validierung der fünf einzelnen Assays.

### **5.3 Validierung der Simoa-Immunoassays**

Um die Richtigkeit und Eignung der entwickelten Simoa-Immunoassays aufzuzeigen, wurde eine Validierung der Assays durchgeführt. Die Validierung erfolgte in einem zweckgerechten Ansatz [27, 28] unter Berücksichtigung von Richtlinien der Europäischen Arzneimittel-Agentur (Abk.: EMA) und der US-amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (Abk.: FDA), insofern diese Richtlinien auf Liganden-Bindungsassays übertragbar waren [23, 24]. Die in

dieser Arbeit beschriebenen Akzeptanzkriterien wurden festgelegt in Anlehnung an die Vorgaben dieser Gesundheitsbehörden.

Hierbei wurden folgende Immunoassay-Parameter bestimmt: Kalibrierkurvenmodell, Bestimmungsgrenzen (obere- und untere Bestimmungsgrenze), Nachweisgrenze, Präzision (Intraassay- und Interassay Präzision), Wiederfindungsrate, Verdünnungslinearität, Parallelität und Analytstabilität (Kurzzeitstabilität und die Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen).

### 5.3.1 Kalibrierkurvenmodell

Das Kalibrierkurvenmodell aller entwickelten Simoa-Assays war ein 4-parametrisch logistischer Kurvenfit (Gewichtung:  $1/Y^2$ ). Die Gewichtung gleicht hierbei die steigende Größe der Residuen mit zunehmender Analytkonzentration aus [29]. Anhand der Wiederfindungsrate und der Präzision wurde die Anwendbarkeit des Kalibrierkurvenmodells geprüft. Die festgelegten Akzeptanzkriterien waren dabei eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 % (bezogen auf die nominale Konzentration) und eine Präzision von kleiner als 20 % VK der Replikate. Die Eignung des gewählten Kalibrierkurvenmodelles konnte für die Analyten IFN- $\gamma$ , IL-2 und PCT aufgezeigt werden. Für die Analyten IL-10 und IL-17 wurden im niedrigen Konzentrationsbereich der Standardkurven (CAL 7, siehe Tabelle 27) die Akzeptanzkriterien nicht eingehalten. Ein Grund dafür ist die fehlende Sensitivität der Antikörperkombinationen in den entsprechenden Konzentrationsbereichen von  $3,2 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$  für IL-10 bzw.  $10,0 \text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$  für IL-17. Aufgrund der fehlenden Sensitivität der Antikörper in diesen niedrigen Konzentrationsbereichen ist ein zuverlässiges Quantifizieren nicht möglich, was sich in erhöhten Variationskoeffizienten bzw. Wiederfindungsraten widerspiegelt. Da für beide Analyten jeweils der niedrigste Kalibrator CAL 7 die Akzeptanzkriterien nicht erfüllte, wurden sie nicht in den Quantifizierungsbereich der jeweiligen Assays eingeschlossen, jedoch als Ankerpunkte (engl.: anchor point) weiterhin mitgeführt. Ankerpunkte außerhalb des Quantifizierungsbereiches können die Gesamtregression verbessern und müssen hierbei keine Akzeptanzkriterien erfüllen [24, 29]. Aus diesem Grund wurde für IL-10 und IL-17 ebenfalls das 4-parametrisch logistische Kurvenmodell mit einer  $1/Y^2$ -Gewichtung angewendet, welche bis zu CAL 6 bzw. bis zum LLoQ eine gute Kurvenanpassung aufzeigte. Für die Analyten IFN- $\gamma$  und IL-2 lag der bestimmte LLoQ-Wert oberhalb von CAL 7, weswegen auch für diese Analyten CAL 7 als Ankerpunkt eingesetzt wurde. Trotz Einsatz von Ankerpunkten bestehen die Kalibrierkurven aller Analyten aus mindestens sechs Kalibrierpunkten, was nach den Richtlinien der Gesundheitsbehörden der Mindestanzahl an Kalibratorpunkten entspricht [23, 24, 29].

Um die Richtigkeit der finalen Kalibrierkurven zu untersuchen, wurde für die Analyten IL-2, IL-10 und IL-17, eine Kalibrierung des eingesetzten Standardproteins (kommerziell erworben,

siehe Tabelle 5) mit WHO-Referenzmaterial (Tabelle 6) durchgeführt. Für die Analyten IFN- $\gamma$  und PCT war kein Referenzmaterial verfügbar. Die Ergebnisse der Kalibrierung mit WHO-Referenzmaterial zeigten, dass das Einführen eines Korrekturfaktors für die drei untersuchten Simoa-Assays notwendig war (Tabelle 28) um die verwendeten Standardproteine an die Referenzwerte anzupassen.

### 5.3.2 Bestimmungs- und Nachweisgrenzen

Die Bestimmungsgrenzen eines Immunoassays definieren den Assaybereich, in welchem der Analyt zuverlässig nachgewiesen (Nachweisgrenze) bzw. quantifiziert (Bestimmungsgrenzen) werden kann [23, 24]. Um diese Grenzen zu definieren, wurden die Nachweisgrenze (engl.: Limit of detection, Abk.: LoD) und die untere und obere Bestimmungsgrenzen (engl.: Lower limit of quantification, Abk.: LLoQ; engl.: Upper limit of quantification, Abk.: ULoQ) ermittelt. Bei der Entwicklung der Simoa-Immunoassays wurde eine möglichst hohe Sensitivität angestrebt. Im Folgenden (Tabelle 39) sind die Bestimmungsgrenzen kommerziell erhältlicher zum Teil hochsensitiver ELISAs (Quantikine High Sensitivity ELISA Kits, R&D Systems) bzw. des B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assays (ThermoFisher Scientific.) und die der entwickelten Simoa-Immunoassay gegenübergestellt, um den erreichten Sensitivitätsgewinn zu verdeutlichen.

**Tabelle 39: Vergleich der Bestimmungsgrenzen der Simoa-Immunoassays mit denen kommerziell erhältlicher ELISAs.**

Informationen zu Quantikine ELISA Kits: R&D Systems Homepage (<https://www.rndsystems.com/>), Stand: 9. April 2020; Informationen zu B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assay: ThermoFisher Scientific Homepage (<https://www.procalcitonin.com/pct-assays/pct-sensitive-kryptor.html>), Stand: 9. April 2020.

„HS“ = hohe Empfindlichkeit (engl.: high sensitivity).

Analyt	Parameter	Entwickelter Simoa-Assay	Kommerzieller Assay (Hersteller, Bestellnr.)
IFN- $\gamma$	LoD. (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,012	5,69 Quantikine ELISA, R&D Systems.
	LLoQ (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,025	15,6 Bestellnummer.: DIF50C
	ULoQ. (pg·mL <sup>-1</sup> )	100	1000
IL-2	LoD. (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,018	0,066 Quantikine HS ELISA, R&D Systems
	LLoQ (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,029	0,30 Bestellnummer: HS200
	ULoQ. (pg·mL <sup>-1</sup> )	60,0	20,0
IL-10	LoD. (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,0006	0,17 Quantikine HS ELISA, R&D Systems
	LLoQ (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,0064	0,80 Bestellnummer: HS100C
	ULoQ. (pg·mL <sup>-1</sup> )	13,0	50,0
IL-17	LoD. (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,015	0,051 Quantikine HS ELISA, R&D Systems
	LLoQ (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,0195	0,20 Bestellnummer: HS170
	ULoQ. (pg·mL <sup>-1</sup> )	40,0	15,0
PCT	LoD. (pg·mL <sup>-1</sup> )	0,438	40 B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assay
	LLoQ (pg·mL <sup>-1</sup> )	1,22	60 Bestellnummer: NA
	ULoQ. (pg·mL <sup>-1</sup> )	900	5·10 <sup>6</sup>

Die in dieser Arbeit entwickelten Simoa-Immunoassays weisen alle eine höhere Sensitivität auf als die kommerziell erhältlichen hochsensitiven ELISAs (Tabelle 39). Für IL-2 und IL-17 wurde eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 10 erreicht. Für die Analyten IFN- $\gamma$ , IL-10 und PCT wurde eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 624 (Quantikine IFN- $\gamma$  Assay: kein hochsensitiver Assay verfügbar), 125 bzw. 50 erreicht. Sensitivitätssteigerungen um den Faktor 10 – 100 sind mit ultrasensitiven Technologien erreichbar und wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [8, 16, 65]. Dies wurde auch bei einem selbstdurchgeführten Methodenvergleich (Simoa- vs. Luminex-Technologie) unter Einsatz der gleichen Assayreagenzien (Antikörper und Kalibratorprotein) bestätigt (Ergebnisse nicht dargestellt). Der dynamische Bereich der entwickelten Simoa-Assays konnte für alle Analyten, mit Ausnahme von PCT, um den Faktor 27 bis 62 im Vergleich zu den kommerziellen Assays (Tabelle 39) gesteigert werden. Hohe dynamische Bereiche ermöglichen es niedrige, als auch relativ gesehen sehr hohe Probenkonzentrationen mit nur einem Probenverdünnungsfaktor zu bestimmen, womit die Anzahl der Messwiederholungen und somit auch Kosten und Zeitaufwand verringert werden kann.

Wichtig ist zudem, dass die Bestimmungsgrenzen einen Konzentrationsbereich einschließen, der den Analytkonzentrationen des zu untersuchenden Probenmaterials entspricht bzw. einen Bereich, welcher durch Verdünnen der Proben (Parallelität) erreicht werden kann. Wie in Kapitel 4.3 gezeigt, ist dies für alle Analyten außer IL-2 in Plasma und Serum gegeben. Außer für IL-2 befinden sich die Konzentrationen der Analyten innerhalb der Bestimmungsgrenzen der in dieser Arbeit entwickelten Assays. Der für IL-2 ermittelte Quantifizierungsbereich von 0,0293 bis 60,0  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  war hingegen nicht ausreichend niedrig für die zuverlässige Bestimmung der Analytkonzentration in gesunden Spendern. Eine Steigerung der Sensitivität könnte hier nur noch durch den Einsatz anderer Antikörper erreicht werden. Durch die im Rahmen der Entwicklung des Assays etablierten Optimierungen der eingesetzten Puffer, Konzentrationen an Reagenzien und des Assayprotokolls konnten keine weiteren Erhöhungen der Sensitivität des IL-2 Assays erzielt werden.

Generell gilt, dass (wie bereits beschrieben) für den absoluten Vergleich der Sensitivität verschiedener Assays ein Abgleich der in den Assays eingesetzten Kalibratorproteine durchgeführt werden müsste. Eigene Erfahrungen zeigten, dass basierend auf den reinen Assay-Kennwerten der Hersteller oftmals eine Konzentrationsbestimmung in humanen Proben zuverlässig möglich sein sollte. Die Ergebnisse zeigen dann aber häufig, dass dies doch nicht der Fall ist und für viele Proben die gemessene Analytkonzentrationen unter dem LLoQ des eingesetzten Assays liegen. Mit der Simoa-Technologie werden im direkten Vergleich dagegen in der Regel für alle gemessenen Proben die Analytlevel oberhalb des Quantifizierungslimits quantifiziert (eigener Erfahrungswert, Ergebnisse nicht dargestellt). Dies zeigt, dass die von den Hersteller angegebene Sensitivitäten ggf. nicht immer korrekt

sind, bzw. die angegebenen Assaysensitivitäten nicht den Konzentrationen in realen Proben bei einer Messung von nativem Protein entsprechen. Dies wiederum kann unter der Annahme, dass ein international gültiger Referenzstandard gleich wie das native Protein erkannt wird, geprüft werden, wie in dieser Arbeit erfolgt (Kapitel 4.2.2). Zusätzlich ist für solche Vergleiche die Vermessung von identischen Probensets mit den unterschiedlichen Testsystemen von Vorteil, um eine gleichartige Erkennung von rekombinantem und nativem Protein in der zu testenden Probenmatrix zu verifizieren.

### 5.3.3 Präzision und Wiederfindungsrate

Ebenfalls wichtige Parameter zur Beurteilung der Qualität von Immunoassays sind die Präzision und die Wiederfindungsrate eines Immunoassays [23, 24]. Die Intraassay- und Interassay-Präzision sowie die Wiederfindungsrate wurden im hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich der Simoa-Immunoassays bestimmt. Die Bestimmung der Intraassay- und Interassay-Präzision erfolgte unter Verwendung von QC-Proben (Tabelle 19). Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde humanes Plasma mit unterschiedlichen Mengen an rekombinantem Protein versetzt (Tabelle 20).

Die Akzeptanzkriterien zur Bestimmung der Intraassay-Präzision waren ein VK von  $< 15\%$  bzw.  $< 20\%$  in den Bereichen des LLoQ bzw. ULoQ. Die Akzeptanzkriterien zur Bestimmung der Interassay-Präzision waren ein VK von  $< 20\%$  bzw.  $< 30\%$  für die Bereiche des LLoQ bzw. ULoQ. Die Wiederfindungsrate sollte im gesamten Messbereich zwischen 80 und 120 %, bezogen auf die eingesetzte Konzentration des rekombinanten Proteins, liegen. Liegt die Wiederfindungsrate außerhalb dieses Bereiches, sollte sie zumindest über den gesamten dynamischen Assaybereich konstant sein.

Für alle Analyten konnten die Akzeptanzkriterien der Intraassay- und Interassay-Präzision eingehalten werden. Dies zeigt, dass die verwendeten Kalibrierkurvenmodelle geeignet sind und die Rückrechnung der Konzentration innerhalb des dynamischen Bereiches zuverlässige Ergebnisse liefert. Dies ist von hoher Wichtigkeit um Ergebnisse unterschiedlicher Analyseläufe, z. B. innerhalb einer zeitlich langfristig angelegten Studie, vergleichen zu können.

Die Kriterien der Wiederfindungsrate wurden von allen Assays bis auf IL-10 erfüllt. Der IL-10 Assay zeigte für die Probe im hohen Konzentrationsbereich eine zu hohe Wiederfindungsrate (138 %). Für die weiteren zwei getesteten Proben lagen die Wiederfindungsraten im Akzeptanzbereich. Dies lässt ausschließen, dass es Unterschiede in der Signal-Konzentrationsbeziehung zwischen der biologischen Matrix und der in Puffer hergestellten Kalibrierkurve gibt. Generelle Matrixeffekte lassen sich demnach auch ausschließen. Da nur eine der drei getesteten Proben die Akzeptanzkriterien nicht erfüllte, wurde die Wiederfindung als akzeptierbar gewertet.

Die Ergebnisse der Präzision und der Wiederfindungsrate zeigen, dass mit den entwickelten Simoa-Immunoassays eine zuverlässige Bestimmung der Analytkonzentration erzielt wird.

### **5.3.4 Verdünnungslinearität und Parallelität**

Die Verdünnungslinearität zeigt auf, ob der zu bestimmende Analyt, mit einer Probenkonzentration oberhalb des ULoQ-Wertes, nach Verdünnung in den Quantifizierungsbereich mit ausreichender Richtigkeit quantifiziert werden kann. Es bestimmt inwieweit die Signal-Konzentrationsbeziehung des Analyten in einer biologischen Matrix nach Verdünnung in Puffer linear ist, wobei hier der Einfluss der Matrix durch starkes Verdünnen vernachlässigbar ist [23, 28, 32]. Die Parallelität zeigt auf, ob die Bindungseigenschaften der Antikörper an das endogene Protein der Bindung an das rekombinante Kalibratorprotein entspricht [23, 28, 34]. Für die Untersuchung der Parallelität wird im Gegensatz zur Verdünnungslinearität die biologische Matrix nicht mit Kalibratorprotein versetzt, d. h. untersucht wird allein endogenes Material. Daher werden Proben mit hoher endogener Analytkonzentration benötigt. Ist keine Linearität oder Parallelität gegeben, werden durch die Rückrechnung der Verdünnung falsche Konzentrationswerte erhalten und das Vergleichen von unterschiedlich verdünnten Proben ist somit nicht möglich. Das festgelegte Akzeptanzkriterium für die Verdünnungslinearität und die Parallelität war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 %, bezogen auf den ermittelten Referenzwert.

Die Ergebnisse der Verdünnungslinearität- und Parallelitätsbestimmung zeigten, dass für die entwickelten Simoa-Assays die Akzeptanzkriterien über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich gegeben waren.

Für IL-2 konnte keine Parallelität bestimmt werden. Wie beschrieben, sind für die Prüfung der Parallelität Proben mit hohem endogenen Analytlevel notwendig, welche für IL-2 nicht vorhanden waren. Da Angaben zur Parallelität für diesen Assay fehlen, können Analysen nur unter Verwendung eines einheitlichen Verdünnungsfaktors (Verdünnungsfaktor basierend auf Verdünnungslinearitätsbestimmung: 4) durchgeführt werden. Sollten Proben mit hoher endogener Analytkonzentration analysiert werden, wären diese zunächst in mehreren Verdünnungen zu analysieren und mit den erhaltenen Ergebnissen die Parallelität zu bewerten.

### **5.3.5 Analytstabilität**

Die Analytstabilität in der zu untersuchenden Matrix wird untersucht, um sicherzustellen, dass Probenvorbereitungsschritte und Lagerbedingungen die gemessene Konzentration des Analyten nicht beeinflussen [23-25, 28, 32]. Durch mehrfache Analyse einer Probe (z. B. Bestimmung mehrerer Analyten aus einer Probe, Messwiederholungen etc.) können zudem mehrere Einfrier- und Auftauzyklen notwendig werden. Dabei können nicht optimale

Lagerbedingungen sowie Einfrier- und Auftauzyklen zu Änderungen der Proteinstruktur führen [131], sodass diese ggf. von den eingesetzten spezifischen Antikörpern nicht mehr erkannt werden und dies zu einer inkorrekten Quantifizierung des Analyten führt.

Die Analytstabilität wurde bezogen auf die Lagertemperatur (2 - 8°C und RT) Lagerzeit (2, 4 und 24 h) und die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen (1 bis 3 Zyklen) bestimmt. Das festgelegte Akzeptanzkriterium zur Bestimmung der Analytstabilität war eine Wiederfindungsrate von 80 bis 120 %, bezogen auf die Referenzprobe (selbe Blutprobe gelagert bei < -60 °C bis zur Analyse ohne Einfrier- und Auftauzyklen).

Die Ergebnisse der Analytstabilität zeigten, dass diese für alle untersuchten Analyten, ausgenommen für IL-17, unter allen getesteten Bedingungen gegeben war. Eine Lagerung von 24 h bei RT führte zu einer starken Unterquantifizierung von IL-17 (WFR = 51.9 %). Nach 4 h Lagerung bei RT lag die Wiederfindungsrate für IL-17 noch innerhalb des Akzeptanzbereiches (WFR = 86,4 %), jedoch deutete sich hierbei ein Trend zu niedrigen Konzentrationen an. Dies zeigt auf, dass zur Analyse von IL-17 keine Probenlagerung bei RT erfolgen sollte und auf eine Lagerung bei 2 bis 8 °C ausgewichen werden sollte, was auch dem normalen Vorgehen in analytisch arbeitenden Laboren entspricht.

### **5.3.6 Korrelation des entwickelten PCT Simoa-Assays mit Messungen eines klinischen Analyzers**

Um die Richtigkeit des entwickelten PCT Simoa-Assays zu untersuchen, wurde ein Methodenvergleich mit dem klinischen Analyzer (B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assay, [123]) durchgeführt. Hierfür wurden Proben mit hoher, mittlerer und niedriger Analytkonzentration mit beiden Methoden analysiert. Die Validierung des PCT Simoa-Assays erfolgte für EDTA-Plasma als Probenmatrix. Um die geplante Analyse von Serum und Zerebrospinalflüssigkeitsproben mit dem entwickelten PCT Assay durchführen zu können, wurde zusätzlich zu Plasma mit diesen beiden Probenarten der Methodenvergleich durchgeführt. So konnte eine Aussage über die korrekte Quantifizierung und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse getroffen werden. Hierbei war ein Ziel, trotz unterschiedlicher dynamischer Bereiche der beiden Methoden (Simoa PCT: 1,22 bis 900 pg·mL<sup>-1</sup>; B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assay: 60,0 bis 5·10<sup>6</sup> pg·mL<sup>-1</sup>), Ergebnisse für eine möglichst große Probenanzahl mit beiden Methoden zu generieren. Hierfür wurden für den hohen Konzentrationsbereich Proben von Spendern mit bekannter bakterieller Infektion (Meningitis) analysiert. Ein Methodenvergleich im niedrigen Konzentrationsbereich des PCT Simoa-Assay war aufgrund der unteren Bestimmungsgrenze des Referenz-Assays nicht möglich. Von 81 untersuchten Proben konnten mit dem B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assay in 39 keine PCT Konzentration ermittelt werden, da die Konzentrationen dieser Proben unterhalb des LLoQ-Wertes des klinischen Analysegerätes lagen. Mit dem PCT Simoa-Assay konnte

hingegen für alle Proben die PCT Konzentration ermittelt werden.

Die mit dem Simoa-Assay ermittelte PCT Konzentrationen der humanen Proben korrelierten positiv mit den Konzentrationsergebnissen des klinischen B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor Assays (Passing-Bablok-Regressionsgerade:  $y = 3,69x - 0,179$ ; Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman: 0,884).

Um die mit dem PCT Simoa-Assay erhaltenen Messergebnisse an die Referenzmethode anzupassen, wurde eine Berichtigung des proportionalen Unterschiedes (Steigung) implementiert. Da der Einfluss des konstanten Fehlers auf Konzentrationswerte  $< 60 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (allgemein auf niedrige Konzentrationswerte) stärker war als auf hohe Konzentrationen, wäre jedoch für die Korrektur des konstanten Unterschiedes eine Korrelationsuntersuchung auch für niedrige Konzentrationen notwendig gewesen. Dies war technisch nicht möglich, da aufgrund der Sensitivität des klinischen Analysegerätes keine Korrelationsuntersuchung für einen Konzentrationsbereich unterhalb von  $60 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (LLoQ-Wert) durchgeführt werden konnte. Aus diesem Grund konnte keine Berichtigung der konstanten Differenz der beiden Methoden durchgeführt werden, sondern nur die beschriebene Korrektur des proportionalen Unterschiedes. Die Ergebnisse der Korrelation und die erhaltenen Korrelationskoeffizienten zeigten jedoch auf, dass eine Korrelation vorlag und dass der entwickelte PCT Simoa-Assay sich zur Analyse von humanen Plasma-, Serum- und CSF-Proben eignete.

#### **5.4 Quantifizierung der Konzentration von IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-17 und PCT in Blutproben gesunder Spender**

Zytokine sind wichtige Biomarker und Indikatoren für physiologische oder pathologische Prozesse und spielen z. B. eine Schlüsselrolle bei der Arzneimittelentwicklung. Zytokinbasierte diagnostische Assays werden in Forschung und klinischer Praxis zunehmend eingesetzt. Erhöhte Zytokinkonzentration im Blut können z. B. auf Entzündungen oder entzündliche Erkrankungen hinweisen [64]. Demnach ist die Detektion von Änderungen der Zytokinkonzentration von großer Bedeutung, um ggf. zwischen gesunden und kranken Zuständen unterscheiden zu können. Zur Beurteilung solcher gegebenenfalls vorliegenden Änderungen werden Normwerte gesunder Spender benötigt. Mit Hilfe der entwickelten hochsensitiven Simoa-Assays sollten diese in humanen Proben (Serum und EDTA-Plasma) gesunder Spender ermittelt werden. Die Bestimmung der Analytlevel erfolgte durch Analyse von ca. 45 Plasma- bzw. Serumproben. Für die analysierten humanen Blutproben gesunder Spender konnten, für alle Analyten außer IL-2, in allen Proben Konzentrationen oberhalb der jeweiligen unteren Bestimmungsgrenze der Simoa-Assays detektiert werden.

Publikationen unterschiedlicher Forschungsgruppen weisen zum Teil sehr unterschiedliche Zytokinkonzentrationen auf (z. B. [132-134]). Diese wurden im Allgemeinen mit nicht hochsensitiven Analysemethoden bestimmt. Die dabei ermittelten Konzentrationen sind sehr

uneinheitlich und weichen teilweise stark von denen in dieser Arbeit bestimmten Konzentrationen der jeweiligen Analyten ab. Die drei exemplarisch genannten Arbeiten [132-134] listen zum Beispiel IL-10 Konzentrationen in Serum gesunder Spender von 12,6 (Median), 1,32 (Mittelwert) oder  $0,07 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Mittelwert) auf. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Simoa-Immunoassay wurde in humanem Serum eine IL-10 Konzentration von  $1,40 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Mittelwert; Median =  $1,28 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) bestimmt. Für IL-2 werden in den drei Publikationen Konzentrationen von 14,0 (Median), 10,6 (Mittelwert) oder  $5,13 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Mittelwert) gelistet, wohingegen mit dem entwickelten Simoa-Assay, trotz deutlich höherer Empfindlichkeit und im Abgleich mit einem internationalen Referenzstandard, nur in fünf der 85 getesteten Proben der gesunden Spender eine IL-2 Konzentration ermittelt werden konnte. Alle weiteren Konzentrationen lagen unter dem LLoQ von  $0,177 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . In der Literatur werden, wie beschrieben, häufig höhere Zytokinkonzentrationen berichtet. Mit zunehmender Anzahl hochsensitiver Methoden werden weitere Datensätze veröffentlicht in denen die Konzentration der Zytokine mit diesen Methoden bestimmt werden und diese zum Teil ebenfalls deutlich niedrige Zytokinkonzentrationen berichten. Diese Daten sind mit den hier bestimmten Analytkonzentrationen vergleichbar [8, 13, 65]. Für IL-2 wird zum Beispiel eine Analytkonzentration von  $0,52 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Median) berichtet, hierbei konnten aber in dieser Arbeit nur für drei der 15 analysierten Proben eine Analytkonzentration bestimmt werden [65]. Dies entspricht den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen. Für IL-10 wird in Serum ein Median von  $1,28 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (100% messbare Proben) berichtet, dies entspricht exakt der in dieser Arbeit bestimmten IL-10 Konzentration in der gleichen Matrix [65]. Aber auch hier wird z. B. für IFN- $\gamma$  eine um den Faktor 66 höhere Konzentration, verglichen mit der hier ermittelten Konzentration, bestimmt [65].

Solche deutlichen Unterschiede können im Allgemeinen viele verschiedene Gründe haben. Zum einen die natürliche biologische Variabilität der Spender (Alter, Geschlecht, etc.), die Probenentnahme [135], aber natürlich auch die Nachweismethode [136]. Neben verschiedenen Technologien werden zur Analyse aber auch in den verschiedenen Assays zum Teil sehr unterschiedliche Assayreagenzien wie Antikörper oder Standardproteine eingesetzt. Auch der Einsatz gleicher Reagenzien auf unterschiedlichen Assayplattformen kann bei der Analyse der gleichen Proben zu Unterschieden in der Quantifizierung der Analyten führen. Ein wünschenswerter und wichtiger Schritt für eine bessere Vergleichbarkeit berichteter Analytkonzentrationen, trotz der Verwendung unterschiedlicher Technologien bzw. Reagenzien und somit zur Eliminierung von Fehlerquellen, wäre eine Kalibrierung der Assays mit Referenzmaterial [136]. Eine Kalibrierung sollte hierbei bei der Assayentwicklung erfolgen (analog zu z. B. Analysemethoden in akkreditierten Laboren) oder vor der Veröffentlichung von Ergebnissen, die mit kommerziell erhältlichen Immunoassays (wenn nicht durch Kithersteller erfolgt) ermittelt wurden. Um dies zu gewährleisten, wurden die im Rahmen dieser

Arbeit entwickelten Simoa-Assays, wenn immer möglich (IL-2, IL-10 und IL-17) mit WHO-Standardmaterial kalibriert, weswegen eine korrekte Quantifizierung angenommen werden kann. Eine gängige Methode zur externen Qualitätssicherung einer Analyseverfahren sind Ringversuche. Diese ermöglichen es Aussagen über die Messgenauigkeit bzw. über die Messqualität der teilnehmenden Laboratorien zu treffen. So müssen z. B. akkreditierte Prüflaboratorien gemäß der Norm DIN EN ISO/IEC 17025 regelmäßig an Ringversuchen teilnehmen, um die Qualität ihrer Ergebnisse sicherzustellen.

### **5.5 Bestimmung von PCT in Patientenproben mit diagnostizierter Meningitis**

Procalcitonin (Abk.: PCT) ist ein wichtiger Biomarker für die klinische Diagnose bakterieller Infektionen [66-69]. Die diagnostische Aussagekraft von PCT zur Unterscheidung zwischen einer bakteriellen und einer viralen Meningitis wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht, da eine frühzeitige Erkennung einer bakteriellen bzw. viralen Meningitis entscheidend für die rechtzeitige Einleitung einer Behandlung ist. Gleichzeitig kann bei Vorliegen einer viralen Ursache auf eine unnötige Gabe von Antibiotika verzichtet werden. Eine Literaturrecherche (Velissaris D. et al., 2018; [93]) der aktuell veröffentlichten Literatur (38 Publikationen einbezogen) zeigt, dass PCT in Serum ein guter Biomarker für die Diagnose der bakteriellen Meningitis ist, wohingegen die Aussagekraft von PCT in CSF begrenzt ist bzw. die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen nicht eindeutig sind [93]. Als allgemeingültiger PCT Grenzwert für gesunde Personen gilt eine Konzentration in Serum von unter 0,1 bzw. 0,05 ng·mL<sup>-1</sup> [75, 137, 138] welches zugleich in etwa der unteren Bestimmungsgrenze des B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor (Referenzmethode; LLoQ = 0,06 ng·mL<sup>-1</sup>) oder des LIAISONs BRAHMS PCT II GEN-Assays (LLoQ = 0,04 ng·mL<sup>-1</sup>) [138] entspricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die PCT-Konzentrationsbestimmung im niedrigen pg·ml<sup>-1</sup>-Konzentrationsbereich bzw. unterhalb des etablierten PCT-Grenzwertes von 0,05 ng·mL<sup>-1</sup>, es ermöglichen könnte, PCT auch als Biomarker einer viralen Meningitis im Rahmen der Diagnose der Erkrankung einzusetzen. Für die Erörterung dieser Arbeitshypothese wurde untersucht, ob es signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit diagnostizierter viraler Meningitis und gesunden Spendern gibt, aber auch zwischen Patienten mit diagnostizierter viraler und bakterieller Meningitis.

Mit dem entwickelten PCT Simoa-Assay wurden dafür sowohl Patientenproben (Serum und CSF) mit diagnostizierter bakterieller (Abk.: BM, n = 15) und viraler Meningitis (Abk.: VM, n = 15), als auch Vergleichsproben (Kontrollgruppe, n = 15) von Patienten ohne diagnostizierter Meningitis analysiert. Für alle analysierten Proben lag die PCT-Konzentration innerhalb der Bestimmungsgrenzen des entwickelten Simoa-Immunoassays. In Serum und CSF konnten die BM-Patienten von den VM-Patienten und der Kontrollgruppe unterschieden werden, jedoch zeigten sich keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen anderen

Patientengruppen. Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse konnten die Arbeitshypothese demnach nicht bestätigen. Es war somit nicht möglich zwischen gesunden Spendern und Patienten mit diagnostizierter viraler Meningitis zu diskriminieren, was PCT zu keinem Biomarker für eine virale Meningitis macht. Die Ergebnisse zeigten jedoch die erwarteten signifikanten Unterschiede zwischen der BM-Gruppe und der Kontrollgruppe bzw. der VM-Patienten. Mit dem entwickelten PCT Simoa-Assay konnte demnach die in der Literatur beschriebene diagnostische Aussagekraft von PCT zur Diagnose einer bakteriellen Infektion bzw. Meningitis bestätigt werden, konnte aber nicht um virale Infektionen erweitert werden.

### **5.6 Quantifizierung der Analytkonzentration IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-17 und PCT in Blutproben ausdauertrainierter Probanden**

Hochleistungssport ist nur über effiziente und maßgeschneiderte Trainings- und Wettkampfsteuerung möglich. Um eine solche gezielte und personalisierte Trainingssteuerung zu erzielen, ist ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen unter anderen auf molekularer, zellulärer und physiologischer Ebene wichtig. Hierbei helfen Biomarker Belastungseffekte aufzuzeigen. Änderungen der Konzentrationen können auf langfristige Trainingseffekte hinweisen und so eine Trainingsüberwachung ermöglichen [94, 96].

Mit Hilfe der entwickelten hochsensitiven Simoa-Assays sollte untersucht werden, ob die erhöhte Sensitivität es ermöglicht neue Analyten zu identifizieren, die bei Belastung Änderungen der Analytkonzentration aufweisen. Hierfür wurden Plasmaproben gesunder männlicher ausdauertrainierter Probanden vor und nach einer hohen Belastungsintensität mit den entwickelten Simoa-Assays analysiert. Die Probenentnahme, der in dieser Arbeit analysierten Proben, erfolgte dabei vor der Einlaufphase (in Ruhe), 30 Minuten nach dem Tempodauerlauf und nochmals zwei Stunden nach dem Tempodauerlauf. Der Tempodauerlauf erfolgte bei 105 % IAS (individuelle anaerobe Schwelle) für 30 min. Für die Kontrolle der Belastungsintensität wurde die Laktatkonzentration der Probanden an fünf Zeitpunkten vor und nach der Belastung bestimmt (durchgeführt durch Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Sportmedizin).

Der Verlauf der Laktatkonzentrationen zeigte, dass während der 30-minütigen Belastung der Belastungsbereich der Probanden im Bereich der aeroben-anaeroben Schwelle lag. Dieser Schwellenbereich sollte während der Belastung erzielt werden, um die maximale Laufgeschwindigkeit ohne Übersäuerung der Muskulatur (Laktaterzeugung > Laktatabbau) der Probanden zu erreichen. Gleichzeitig erfolgt hierdurch eine an den Trainingsstatus der einzelnen Probanden angepasste Belastung [139]. Dies entspricht einer Normalisierung und ermöglicht es die Ergebnisse der einzelnen Probanden untereinander vergleichen und zusammenzufassen zu können.

Mit Hilfe einer statistischen Auswertung der Simoa-Messergebnisse wurde untersucht, ob

signifikante Unterschiede zwischen den drei Abnahmezeitpunkten vorlagen. Hierbei wurde die relative Konzentrationsänderung bezogen auf die Analytkonzentration vor der Belastung untersucht. Die IL-17 Ergebnisse wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Die IL-17 Konzentration ist demnach nicht abhängig von der hier getesteten Belastung und eignet sich nicht als Indikator für Trainingseffekte. Für IFN- $\gamma$  zeigten sich zwei Stunden nach dem Tempodauerlauf leicht signifikant niedrigere Analytkonzentration. Dies entspricht Beobachtungen in stimulierten Vollblutkulturüberständen [140]. Das Ausmaß der Abnahme war hierbei abhängig von der Belastung und Anstiege der IFN- $\gamma$  Konzentration wurden bis zu 24 h nach der Belastung beobachtet. IFN- $\gamma$  könnte sich demnach als Indikator eignen, für eine bessere Beurteilung wäre es aber nötig unterschiedliche Belastungsstärken bzw. Belastungsdauern vergleichend zu untersuchen. Die in dieser Arbeit ermittelte IL-10 Konzentration stieg nach der Belastung signifikant an und sank 2 h nach der Belastung nicht wieder ab. In der Literatur werden unterschiedliche Effekte beschrieben. Zum Teil decken sich diese mit dem hier Beschriebenen und die IL-10 Konzentration steigt signifikant nach körperlicher Belastung an [94]. Es wird aber auch eine Abnahme von IL-10 nach Belastung beschrieben [141]. Die durchgeführten Belastungsintensitäten waren in den verschiedenen Studien unterschiedlich (z. B. 30 min 105 % IAS vs. 50 min 80 % IAS), was auch hier womöglich auf eine Anhängigkeit der IL-10 Konzentration von der Belastung hinweist. Dies könnte auf eine Aussagekraft von IL-10 auf die Art der Belastung hinweisen, müsste aber näher untersucht werden. PCT zeigte einen signifikanten Anstieg direkt nach der Belastung und einen Rückgang der Konzentration auf das Ausgangslevel 2 h nach der Belastung. Dies deckt sich zum Teil mit den in der Literatur beschriebenen Effekten. Direkt nach einem 100-km-Lauf unter realen Wettkampfbedingungen (sehr starke Belastung) wurden ebenfalls signifikant erhöhte PCT Konzentrationen ermittelt, diese stiegen jedoch auch 24 h nach der Belastung weiter an [110]. Starke Belastungen haben demnach einen hohen Effekt, wohingegen der Effekt bei niedriger Belastung (wie in dieser Arbeit) zwar geringer ist, aber mit dem hochsensitiven Simoa-Assay nachweisbar war. Demnach könnte sich PCT auch als Indikator für geringere Belastungen eignen und müsste nochmals ggf. mit unterschiedlichen Belastungsstärken und unterschiedlichen Erholungsdauern genauer untersucht werden.

Die hier ermittelten Daten legen dar, dass ein 30-minütiger Tempodauerlauf ausdauertrainierter Sportler im Bereich der aeroben-anaeroben Schwelle zum Teil Einflüsse auf die Konzentration der Analyten hat, aber diese zum Teil geringer sind als in der Literatur beschrieben. Die hier getestete körperliche Gesamtbelastung tritt womöglich hinter den Trainingseffekt zurück. Um dies auszuschließen und um zu untersuchen ab welcher Belastung die untersuchten Analyten ggf. deutlich signifikanter ansteigen, müssten unterschiedliche Belastungsstärken, Belastungsdauern aber auch Erholungsphasen untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Proteinbiomarker sind ein wichtiger Bestandteil der Diagnose, Verlaufsbeurteilung und Risikoeinschätzung von Krankheiten in der Medizin, aber auch ein wichtiger Bestandteil der Forschung und der Arzneimittelentwicklung. Viele dieser Biomarker lassen sich mit herkömmlichen Immunoassays, aufgrund der fehlenden Sensitivität der Technologien, nicht quantifizieren. Dies schwächt die Aussagekraft und die Interpretation von Biomarkern und kann auch dazu führen das Biomarker nicht als solche eingesetzt werden können. Der Bedarf an Sensitivität führte zur Entwicklung von hochsensitiven Immunoassay-Plattformen wie der Single Molecule Array (Abk.: Simoa) -Technologie der Firma Quanterix. Diese nun erreichbaren Sensitivitäten haben das Potential neue diagnostische Biomarker zu identifizieren und zu etablieren. Simoa-Assays sind Mikrosphären basierte ELISAs, die aufgrund von extrem kleinen individuellen Reaktionsräumen gekoppelt mit einer Signalamplifikation den hoch sensitiven Nachweis von niedrigkonzentrierten Analyten ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden hochsensitive Simoa-Immunoassays für die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 und IL-17 und dem Entzündungsmarker PCT entwickelt, die eine hoch sensitive, präzise und einfache Quantifizierung dieser Analyten in Serum, Plasma oder CSF ermöglichen. Die entwickelten Simoa-Immunoassays sind semiautomatisierte Assays, die eine parallele Bearbeitung einer großen Probenanzahl ermöglichen.

Im Anschluss an die Entwicklungsphase wurden die Immunoassays in einem zweckgerichteten Ansatz, unter Berücksichtigung der entsprechenden Richtlinien der Gesundheitsbehörden EMA und FDA, validiert. Anhand der ermittelten Validierungsparameter konnte aufgezeigt werden, dass die Sensitivitäten sehr gut und die dynamischen Bereiche passend sind.

Die Anwendbarkeit der Assays zur Quantifizierung der Analyten in humanen Serum- und Plasmaproben gesunder Spender wurde in dieser Arbeit gezeigt und für vier der Analyten (ausgenommen IL-2) aufgrund der ausreichenden Sensitivität der Immunoassays ein Referenzbereich gesunder Spender ermittelt.

Des Weiteren wurde mit dem entwickelten hochsensitiven PCT Simoa-Assay untersucht, ob die Bestimmung der PCT Konzentration bis in den niedrigen Konzentrationsbereich, die diagnostische Aussagekraft von PCT für die Differenzierung zwischen einer bakteriellen und einer viralen Meningitis steigern kann. Wäre diese Arbeitshypothese korrekt könnte PCT, anders als bisher beschrieben, auch als Biomarker für eine virale Meningitis in der Klinik eingesetzt werden und könnte eine schnellere Diagnose der zugrundeliegenden Ursache ermöglichen. Zur Untersuchung dieser Arbeitshypothese wurde zunächst ein Methodenvergleich zwischen dem entwickelten PCT Simoa-Assay und dem klinischen

B·R·A·H·M·S PCT-Sensitive Kryptor-Assay durchgeführt. Es konnte eine gute Korrelation zwischen dem neu entwickelten PCT Assays und der in der Routinediagnostik oft angewendeten Methode zur Quantifizierung von PCT demonstriert werden. Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse konnten die Arbeitshypothese jedoch nicht bestätigen. Mit dem entwickelten PCT Simoa-Assay konnte nicht zwischen gesunden Spendern und Patienten mit diagnostizierter viraler Meningitis diskriminiert werden, was PCT zu keinem Biomarker für eine virale Meningitis macht. Es konnte aber die in der Literatur beschriebene diagnostische Aussagekraft von Procalcitonin zur Diagnose einer bakteriellen Meningitis bestätigt werden. Zuletzt wurde untersucht, ob mit Hilfe der entwickelten hochsensitiven Immunoassays neue Biomarker als Indikatoren des Trainings- und Belastungsprozesses bei Sportlern ermittelt werden können. Die Ergebnisse zeigten, dass ein 30-minütiger Tempodauerlauf ausdauertrainierter Sportler im Bereich der aeroben-anaeroben Schwelle Einflüsse auf die Konzentration der Analyten IFN- $\gamma$ , IL-10 und PCT im Serum der Probanden hat. Diese waren aber zum Teil geringer als in der Literatur beschrieben. Um zu untersuchen, ab welcher Belastung die untersuchten Analyten ggf. deutlich signifikanter ansteigen, müssten unterschiedliche Belastungsstärken, Belastungsdauern aber auch Erholungsphasen untersucht werden.

Mit den neu entwickelten Simoa-Assays wurde gezeigt, dass Sensitivitäten bis in den niedrigen  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ -Konzentrationsbereich für die gewählten Proteinbiomarker erreicht werden können. Dies ermöglicht es bereits bestehende Aspekte, aber auch neue Fragestellungen zu untersuchen, und kann somit zu weiteren Erkenntnissen bei der Erforschung von inflammatorischen Prozessen führen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Wild, D., *Chapter 1.2 - Immunoassay for Beginners*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. 7-10.
2. Davies, C., *Chapter 2.1 - Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA)1*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. 29-59.
3. Chang, L., D.M. Rissin, D.R. Fournier, T. Piech, P.P. Patel, D.H. Wilson, and D.C. Duffy, *Single molecule enzyme-linked immunosorbent assays: theoretical considerations*. *J Immunol Methods*, 2012. **378**(1-2): 102-15.
4. Shaw, L.M., H. Vanderstichele, M. Knapik-Czajka, C.M. Clark, P.S. Aisen, R.C. Petersen, K. Blennow, H. Soares, A. Simon, P. Lewczuk, R. Dean, E. Siemers, W. Potter, V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects*. *Ann Neurol*, 2009. **65**(4): 403-13.
5. Rusling, J.F., C.V. Kumar, J.S. Gutkind, and V. Patel, *Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer*. *Analyst*, 2010. **135**(10): 2496-511.
6. Novo, P., D.M. Prazeres, V. Chu, and J.P. Conde, *Microspot-based ELISA in microfluidics: chemiluminescence and colorimetry detection using integrated thin-film hydrogenated amorphous silicon photodiodes*. *Lab Chip*, 2011. **11**(23): 4063-71.
7. Fischer, S.K., A. Joyce, M. Spengler, T.Y. Yang, Y. Zhuang, M.S. Fjording, and A. Mikulskis, *Emerging technologies to increase ligand binding assay sensitivity*. *AAPS J*, 2015. **17**(1): 93-101.
8. Yeung, D., S. Ciotti, S. Purushothama, E. Gharakhani, G. Kuesters, B. Schlain, C. Shen, D. Donaldson, and A. Mikulskis, *Evaluation of highly sensitive immunoassay technologies for quantitative measurements of sub-pg/mL levels of cytokines in human serum*. *J Immunol Methods*, 2016. **437**: 53-63.
9. Singer, J., G. Altmann, A. Goldenberg, and C. Plotz, *The mechanism of particulate carrier reactions with rheumatoid sera. II. Sensitizing capacity of various human gamma globulins for latex particles*. *Arthritis & Rheumatism*, 1960. **3**: 515-521.
10. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man*. *J Clin Invest*, 1960. **39**: 1157-75.
11. Lipman, N.S., L.R. Jackson, L.J. Trudel, and F. Weis-Garcia, *Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources*. *Ilar j*, 2005. **46**(3): 258-68.
12. Belanger, L., C. Sylvestre, and D. Dufour, *Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures*. *Clin Chim Acta*, 1973. **48**(1): 15-8.
13. Casaletto, K.B., F.M. Elahi, R. Fitch, S. Walters, E. Fox, A.M. Staffaroni, B.M. Bettcher, H. Zetterberg, A. Karydas, J.C. Rojas, A.L. Boxer, and J.H. Kramer, *A comparison of biofluid cytokine markers across platform technologies: Correspondence or divergence?* *Cytokine*, 2018. **111**: 481-489.
14. Wilson, D.H., D.M. Rissin, C.W. Kan, D.R. Fournier, T. Piech, T.G. Campbell, R.E. Meyer, M.W. Fishburn, C. Cabrera, P.P. Patel, E. Frew, Y. Chen, L. Chang, E.P. Ferrell, V. von Einem, W. McGuigan, M. Reinhardt, H. Sayer, C. Vielsack, and D.C. Duffy, *The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing*. *J Lab Autom*, 2016. **21**(4): 533-47.
15. Rissin, D.M., C.W. Kan, T.G. Campbell, S.C. Howes, D.R. Fournier, L. Song, T. Piech, P.P. Patel, L. Chang, A.J. Rivnak, E.P. Ferrell, J.D. Randall, G.K. Provuncher, D.R. Walt, and D.C. Duffy, *Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(6): 595-9.
16. Rissin, D.M., D.R. Fournier, T. Piech, C.W. Kan, T.G. Campbell, L. Song, L. Chang, A.J. Rivnak, P.P. Patel, G.K. Provuncher, E.P. Ferrell, S.C. Howes, B.A. Pink, K.A. Minnehan, D.H. Wilson, and D.C. Duffy, *Simultaneous detection of single molecules and singulated ensembles of molecules enables immunoassays with broad dynamic*

- range. *Anal Chem*, 2011. **83**(6): 2279-85.
17. Rivnak, A.J., D.M. Rissin, C.W. Kan, L. Song, M.W. Fishburn, T. Piech, T.G. Campbell, D.R. DuPont, M. Gardel, S. Sullivan, B.A. Pink, C.G. Cabrera, D.R. Fournier, and D.C. Duffy, *A fully-automated, six-plex single molecule immunoassay for measuring cytokines in blood*. *J Immunol Methods*, 2015. **424**: 20-7.
  18. Gosling, J.P., *A decade of development in immunoassay methodology*. *Clin Chem*, 1990. **36**(8 Pt 1): 1408-27.
  19. Walt, D.R., *Optical methods for single molecule detection and analysis*. *Anal Chem*, 2013. **85**(3): 1258-63.
  20. Niemeyer, C.M., M. Adler, and R. Wacker, *Detecting antigens by quantitative immuno-PCR*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(8): 1918-30.
  21. Todd, J., B. Freese, A. Lu, D. Held, J. Morey, R. Livingston, and P. Goix, *Ultrasensitive flow-based immunoassays using single-molecule counting*. *Clin Chem*, 2007. **53**(11): 1990-5.
  22. Sano, T., C.L. Smith, and C.R. Cantor, *Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates*. *Science*, 1992. **258**(5079): 120-2.
  23. EMEA, *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011, European Medicines Agency; Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
  24. FDA, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (66 FR 28526)*. Federal Register 2001. **66**(100): 28526 - 28527.
  25. FDA, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (Draft)*. 2013, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research
  26. FDA, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 2018*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research
  27. Findlay, J.W., W.C. Smith, J.W. Lee, G.D. Nordblom, I. Das, B.S. DeSilva, M.N. Khan, and R.R. Bowsher, *Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective*. *J Pharm Biomed Anal*, 2000. **21**(6): 1249-73.
  28. Lee, J.W., V. Devanarayan, Y.C. Barrett, R. Weiner, J. Allinson, S. Fountain, S. Keller, I. Weinryb, M. Green, L. Duan, J.A. Rogers, R. Millham, P.J. O'Brien, J. Sailstad, M. Khan, C. Ray, and J.A. Wagner, *Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement*. *Pharm Res*, 2006. **23**(2): 312-28.
  29. Azadeh, M., B. Gorovits, J. Kamerud, S. MacMannis, A. Safavi, J. Sailstad, and P. Sondag, *Calibration Curves in Quantitative Ligand Binding Assays: Recommendations and Best Practices for Preparation, Design, and Editing of Calibration Curves*. *AAPS J*, 2017. **20**. 22.
  30. DeSilva, B., W. Smith, R. Weiner, M. Kelley, J. Smolec, B. Lee, M. Khan, R. Tacey, H. Hill, and A. Celniker, *Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules*. *Pharm Res*, 2003. **20**(11): 1885-900.
  31. DIN, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen - Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*. . DIN ISO 5725-1, 1997. **11**.
  32. Andreasson, U., A. Perret-Liaudet, L.J.C. van Waalwijk van Doorn, K. Blennow, D. Chiasserini, S. Engelborghs, T. Fladby, S. Genc, N. Kruse, H.B. Kuiperij, L. Kulic, P. Lewczuk, B. Mollenhauer, B. Mroczko, L. Parnetti, E. Vanmechelen, M.M. Verbeek, B. Winblad, H. Zetterberg, M. Koel-Simmelink, and C.E. Teunissen, *A Practical Guide to Immunoassay Method Validation*. *Front Neurol*, 2015. **6**. 179.
  33. Braggio, S., R.J. Barnaby, P. Grossi, and M. Cugola, *A strategy for validation of bioanalytical methods*. *J Pharm Biomed Anal*, 1996. **14**(4): 375-88.
  34. Tu, J. and P. Bennett, *Parallelism experiments to evaluate matrix effects, selectivity and sensitivity in ligand-binding assay method development: pros and cons*. *Bioanalysis*, 2017. **9**(14): 1107-1122.
  35. Kenneth Murphy, C.W., *Janeway's Immunobiology*. 9. Aufl. ed. Vol. 9. 2016, New York: Garland Science. 1-904.
  36. Budhu, A. and X.W. Wang, *The role of cytokines in hepatocellular carcinoma*. *J Leukoc*

- Biol, 2006. **80**(6): 1197-213.
37. Ealick, S.E., W.J. Cook, S. Vijay-Kumar, M. Carson, T.L. Nagabhushan, P.P. Trotta, and C.E. Bugg, *Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma*. Science, 1991. **252**(5006): 698-702.
  38. Walter, M.R., W.T. Windsor, T.L. Nagabhushan, D.J. Lundell, C.A. Lunn, P.J. Zauodny, and S.K. Narula, *Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor*. Nature, 1995. **376**(6537): 230-5.
  39. Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume, *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): 163-89.
  40. Hiddemann, W., C. Bartram, and H. Huber, *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie; Teil 2: Solide Tumoren - Lymphome - Leukämien*. Vol. 2. 2004: Springer-Verlag. 2075.
  41. Sen, G.C. and P. Lengyel, *The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry*. J Biol Chem, 1992. **267**(8): 5017-20.
  42. Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann, and M. Modolell, *Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - a bridge built on solid ground*. Immunol Lett, 2001. **75**(2): 159-60.
  43. Golab, J., Zagozdzon, T. Stoklosal, R. Kaminski, K. Kozar, and M. Jakobisiak, *Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18-a bridge too far?* Immunol Lett, 2000. **72**(3): 153-7.
  44. Frucht, D.M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J.J. O'Shea, and S. Koyasu, *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): 556-60.
  45. Salazar-Mather, T.P., T.A. Hamilton, and C.A. Biron, *A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): 985-93.
  46. Schindler, H., M.B. Lutz, M. Rollinghoff, and C. Bogdan, *The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4*. J Immunol, 2001. **166**(5): 3075-82.
  47. Olejniczak, K. and A. Kasprzak, *Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases-a review*. Med Sci Monit, 2008. **14**(10): RA179-89.
  48. Zdanov, A., C. Schalk-Hihi, A. Gustchina, M. Tsang, J. Weatherbee, and A. Wlodawer, *Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma*. Structure, 1995. **3**(6): 591-601.
  49. Liu, Y., S.H. Wei, A.S. Ho, R. de Waal Malefyt, and K.W. Moore, *Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor*. J Immunol, 1994. **152**(4): 1821-9.
  50. Lalani, I., K. Bhol, and A.R. Ahmed, *Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1997. **79**(6): 469-83.
  51. O'Garra, A., R. Chang, N. Go, R. Hastings, G. Haughton, and M. Howard, *Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10*. Eur J Immunol, 1992. **22**(3): 711-7.
  52. Moore, K.W., R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, and A. O'Garra, *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: 683-765.
  53. O'Garra, A., F.J. Barrat, A.G. Castro, A. Vicari, and C. Hawrylowicz, *Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease*. Immunol Rev, 2008. **223**: 114-31.
  54. Hawrylowicz, C.M. and A. O'Garra, *Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): 271-83.
  55. van Der Poll, T., A. Marchant, and S.J. van Deventer, *The role of interleukin-10 in the pathogenesis of bacterial infection*. Clin Microbiol Infect, 1997. **3**(6): 605-607.
  56. Go, N.F., B.E. Castle, R. Barrett, R. Kastelein, W. Dang, T.R. Mosmann, K.W. Moore, and M. Howard, *Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells*. J Exp Med, 1990. **172**(6): 1625-31.
  57. Itoh, K. and S. Hirohata, *The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation*. J Immunol, 1995. **154**(9): 4341-50.
  58. Rousset, F., E. Garcia, T. Defrance, C. Peronne, N. Vezzio, D.H. Hsu, R. Kastelein, K.W. Moore, and J. Banchereau, *Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): 1890-

- 3.
59. Brembilla, N.C., L. Senra, and W.H. Boehncke, *The IL-17 Family of Cytokines in Psoriasis: IL-17A and Beyond*. Front Immunol, 2018. **9**. 1682.
60. Akimzhanov, A.M., X.O. Yang, and C. Dong, *Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): 5969-72.
61. Moseley, T.A., D.R. Haudenschild, L. Rose, and A.H. Reddi, *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(2): 155-74.
62. Miossec, P. and J.K. Kolls, *Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(10): 763-76.
63. Robert, M. and P. Miossec, *IL-17 in Rheumatoid Arthritis and Precision Medicine: From Synovitis Expression to Circulating Bioactive Levels*. Front Med, 2018. **5**. 364.
64. Turner, M.D., B. Nedjai, T. Hurst, and D.J. Pennington, *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): 2563-82.
65. Wu, D., M.D. Milutinovic, and D.R. Walt, *Single molecule array (Simoa) assay with optimal antibody pairs for cytokine detection in human serum samples*. Analyst, 2015. **140**(18): 6277-82.
66. Assicot, M., D. Gendrel, H. Carsin, J. Raymond, J. Guilbaud, and C. Bohuon, *High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection*. Lancet, 1993. **341**(8844): 515-8.
67. Becker, K.L., R. Snider, and E.S. Nylén, *Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations*. Crit Care Med, 2008. **36**(3): 941-52.
68. Müller, B., K.L. Becker, H. Schachinger, P.R. Rickenbacher, P.R. Huber, W. Zimmerli, and R. Ritz, *Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit*. Crit Care Med, 2000. **28**(4): 977-83.
69. Schuetz, P., W. Albrich, and B. Mueller, *Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future*. BMC Med, 2011. **9**. 107.
70. Le Moullec, J.M., A. Jullienne, J. Chenais, F. Lasmoles, J.M. Guliana, G. Milhaud, and M.S. Moukhtar, *The complete sequence of human procalcitonin*. FEBS Lett, 1984. **167**(1): 93-7.
71. Russwurm, S., M. Wiederhold, M. Oberhoffer, I. Stonans, P.F. Zipfel, and K. Reinhart, *Molecular aspects and natural source of procalcitonin*. Clin Chem Lab Med, 1999. **37**(8): 789-97.
72. Dong, R., B. Wan, S. Lin, M. Wang, J. Huang, Y. Wu, Y. Wu, N. Zhang, and Y. Zhu, *Procalcitonin and Liver Disease: A Literature Review*. J Clin Transl Hepatol, 2019. **7**(1): 51-55.
73. Meisner, M., V. Müller, Z. Khakpour, E. Toegel, and H. Redl, *Induction of procalcitonin and proinflammatory cytokines in an anhepatic baboon endotoxin shock model*. Shock, 2003. **19**(2): 187-90.
74. Linscheid, P., D. Seboek, D.J. Schaer, H. Zulewski, U. Keller, and B. Müller, *Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes*. Crit Care Med, 2004. **32**(8): 1715-21.
75. Samsudin, I. and S.D. Vasikaran, *Clinical Utility and Measurement of Procalcitonin*. Clin Biochem Rev, 2017. **38**(2): 59-68.
76. Russwurm, S., I. Stonans, E. Stonane, M. Wiederhold, A. Lubner, P.F. Zipfel, H.P. Deigner, and K. Reinhart, *Procalcitonin and CGRP-1 mRNA expression in various human tissues*. Shock, 2001. **16**(2): 109-12.
77. Sager, R., A. Kutz, B. Mueller, and P. Schuetz, *Procalcitonin-guided diagnosis and antibiotic stewardship revisited*. BMC Med, 2017. **15**(1). 15.
78. Schuetz, P., C. Bretscher, L. Bernasconi, and B. Mueller, *Overview of procalcitonin assays and procalcitonin-guided protocols for the management of patients with infections and sepsis*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. **17**(6): 593-601.
79. Mace, S.E., *Acute bacterial meningitis*. Emerg Med Clin North Am, 2008. **26**(2): 281-317, viii.

80. Chavez-Bueno, S. and G.H. McCracken, Jr., *Bacterial meningitis in children*. *Pediatr Clin North Am*, 2005. **52**(3): 795-810, vii.
81. Ehrenstein, B.P., B. Salzberger, and T. Gluck, [*New developments in the diagnosis and therapy of acute bacterial meningitis*]. *Med Klin (Munich)*, 2005. **100**(6): 325-33.
82. Logan, S.A. and E. MacMahon, *Viral meningitis*. *Bmj*, 2008. **336**(7634): 36-40.
83. Okada, Y., H. Minakami, T. Tomomasa, M. Kato, Y. Inoue, K. Kozawa, H. Kimura, and A. Morikawa, *Serum procalcitonin concentration in patients with Kawasaki disease*. *J Infect*, 2004. **48**(2): 199-205.
84. van de Beek, D., J. de Gans, L. Spanjaard, M. Weisfelt, J.B. Reitsma, and M. Vermeulen, *Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(18): 1849-59.
85. Schuchat, A., K. Robinson, J.D. Wenger, L.H. Harrison, M. Farley, A.L. Reingold, L. Lefkowitz, and B.A. Perkins, *Bacterial meningitis in the United States in 1995*. *Active Surveillance Team*. *N Engl J Med*, 1997. **337**(14): 970-6.
86. Rantakallio, P., M. Leskinen, and L. von Wendt, *Incidence and prognosis of central nervous system infections in a birth cohort of 12,000 children*. *Scand J Infect Dis*, 1986. **18**(4): 287-94.
87. Kupila, L., T. Vuorinen, R. Vainionpaa, V. Hukkanen, R.J. Marttila, and P. Kotilainen, *Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population*. *Neurology*, 2006. **66**(1): 75-80.
88. Frei, K., D. Nadal, H.W. Pfister, and A. Fontana, *Listeria meningitis: identification of a cerebrospinal fluid inhibitor of macrophage listericidal function as interleukin 10*. *J Exp Med*, 1993. **178**(4): 1255-61.
89. Mustafa, M.M., O. Ramilo, X. Saez-Llorens, J. Mertsola, R.R. Magness, and G.H. McCracken, Jr., *Prostaglandins E2 and I2, interleukin 1-beta, and tumor necrosis factor in cerebrospinal fluid in infants and children with bacterial meningitis*. *Pediatr Infect Dis J*, 1989. **8**(12): 921-2.
90. Ohga, S., T. Aoki, K. Okada, H. Akeda, K. Fujioka, A. Ohshima, T. Mori, I. Minamishima, and K. Ueda, *Cerebrospinal fluid concentrations of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha, and interferon gamma in bacterial meningitis*. *Arch Dis Child*, 1994. **70**(2): 123-5.
91. van Furth, A.M., J.J. Roord, and R. van Furth, *Roles of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pathophysiology of bacterial meningitis and effect of adjunctive therapy*. *Infect Immun*, 1996. **64**(12): 4883-90.
92. Linscheid, P., D. Seboek, E.S. Nylén, I. Langer, M. Schlatter, K.L. Becker, U. Keller, and B. Müller, *In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: a novel product of human adipose tissue*. *Endocrinology*, 2003. **144**(12): 5578-84.
93. Velissaris, D., M. Pintea, N. Pantzaris, E. Spatha, V. Karamouzos, C. Pierrakos, and M. Karanikolas, *The Role of Procalcitonin in the Diagnosis of Meningitis: A Literature Review*. *J Clin Med*, 2018. **7**(6): 148.
94. Schild, M., G. Eichner, T. Beiter, M. Zugel, I. Krumholz-Wagner, J. Hudemann, C. Pilat, K. Krüger, A.M. Niess, J.M. Steinacker, and F.C. Mooren, *Effects of Acute Endurance Exercise on Plasma Protein Profiles of Endurance-Trained and Untrained Individuals over Time*. *Mediators Inflamm*, 2016. **2016**: 11. 4851935.
95. Walsh, N.P., M. Gleeson, R.J. Shephard, M. Gleeson, J.A. Woods, N.C. Bishop, M. Fleshner, C. Green, B.K. Pedersen, L. Hoffman-Goetz, C.J. Rogers, H. Northoff, A. Abbasi, and P. Simon, *Position statement. Part one: Immune function and exercise*. *Exerc Immunol Rev*, 2011. **17**: 6-63.
96. Scott, J.P., C. Sale, J.P. Greeves, A. Casey, J. Dutton, and W.D. Fraser, *Cytokine response to acute running in recreationally-active and endurance-trained men*. *Eur J Appl Physiol*, 2013. **113**(7): 1871-82.
97. Peake, J.M., K. Suzuki, M. Hordern, G. Wilson, K. Nosaka, and J.S. Coombes, *Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage*. *Eur J Appl Physiol*, 2005. **95**(5-6): 514-21.
98. Suzuki, K., S. Nakaji, M. Yamada, Q. Liu, S. Kurakake, N. Okamura, T. Kumae, T. Umeda, and K. Sugawara, *Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine*

- and neutrophil responses. *Med Sci Sports Exerc*, 2003. **35**(2): 348-55.
99. Fischer, C.P., *Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?* *Exerc Immunol Rev*, 2006. **12**: 6-33.
100. Brenner, I.K., V.M. Natale, P. Vasiliou, A.I. Moldoveanu, P.N. Shek, and R.J. Shephard, *Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response*. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1999. **80**(5): 452-60.
101. Suzuki, K., S. Nakaji, S. Kurakake, M. Totsuka, K. Sato, T. Kuriyama, H. Fujimoto, K. Shibusawa, K. Machida, and K. Sugawara, *Exhaustive exercise and type-1/type-2 cytokine balance with special focus on interleukin-12 p40/p70*. *Exerc Immunol Rev*, 2003. **9**: 48-57.
102. Hirose, L., K. Nosaka, M. Newton, A. Laveder, M. Kano, J. Peake, and K. Suzuki, *Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors*. *Exerc Immunol Rev*, 2004. **10**: 75-90.
103. Nieman, D.C., J.M. Davis, V.A. Brown, D.A. Henson, C.L. Dumke, A.C. Utter, D.M. Vinci, M.F. Downs, J.C. Smith, J. Carson, A. Brown, S.R. McAnulty, and L.S. McAnulty, *Influence of carbohydrate ingestion on immune changes after 2 h of intensive resistance training*. *J Appl Physiol* (1985), 2004. **96**(4): 1292-8.
104. Smith, L.L., A. Anwar, M. Fragen, C. Rananto, R. Johnson, and D. Holbert, *Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise*. *Eur J Appl Physiol*, 2000. **82**(1-2): 61-7.
105. Toft, A.D., L.B. Jensen, H. Bruunsgaard, T. Ibfelt, J. Halkjaer-Kristensen, M. Febbraio, and B.K. Pedersen, *Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(1): C289-95.
106. Nieman, D.C., D.A. Henson, S.R. McAnulty, L.S. McAnulty, J.D. Morrow, A. Ahmed, and C.B. Heward, *Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship*. *Med Sci Sports Exerc*, 2004. **36**(8): 1328-35.
107. Peters, E.M., R. Anderson, D.C. Nieman, H. Fickl, and V. Jogessar, *Vitamin C supplementation attenuates the increases in circulating cortisol, adrenaline and anti-inflammatory polypeptides following ultramarathon running*. *Int J Sports Med*, 2001. **22**(7): 537-43.
108. Steensberg, A., *The role of IL-6 in exercise-induced immune changes and metabolism*. *Exerc Immunol Rev*, 2003. **9**: 40-7.
109. Peake, J.M., P. Della Gatta, K. Suzuki, and D.C. Nieman, *Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects*. *Exerc Immunol Rev*, 2015. **21**: 8-25.
110. Li, L.H., C.T. Chen, W.F. Kao, Y.H. Chiu, C. Meng, C.C. Hsu, and C.K. How, *Procalcitonin variation before and after 100-km ultramarathon*. *Clin Chem Lab Med*, 2017. **55**(6): e110-112.
111. Lippi, G., F. Schena, M. Montagnana, G.L. Salvagno, and G.C. Guidi, *Acute influence of aerobic physical exercise on procalcitonin*. *Eur J Clin Invest*, 2008. **38**(10): 784-5.
112. Schneider, H.G. and Q.T. Lam, *Procalcitonin for the clinical laboratory: a review*. *Pathology*, 2007. **39**(4): 383-90.
113. Grabarek, Z. and J. Gergely, *Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters*. *Anal Biochem*, 1990. **185**(1): 131-5.
114. Shapiro, S.S. and M.B. Wilk, *An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)*. *Biometrika*, 1965. **52**(3/4): 591-611.
115. Pirie, W., *Spearman Rank Correlation Coefficient*, in *Encyclopedia of Statistical Sciences*. 2006.
116. Mukaka, M.M., *Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research*. *Malawi Med J*, 2012. **24**(3): 69-71.
117. Passing, H. and Bablok, *A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I*. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1983. **21**(11): 709-20.
118. Bilic-Zulle, L., *Comparison of methods: Passing and Bablok regression*. *Biochem Med (Zagreb)*, 2011. **21**(1): 49-52.

119. Mann, H.B. and D.R. Whitney, *On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other*. Ann. Math. Statist., 1947. **18**(1): 50-60.
120. Wilcoxon, F., *Individual Comparisons by Ranking Methods*. Biometrics Bulletin, 1945. **1**(6): 80-83.
121. Williamson, D.F., R.A. Parker, and J.S. Kendrick, *The box plot: a simple visual method to interpret data*. Ann Intern Med, 1989. **110**(11): 916-21.
122. Kremmer, E., K. Meyer, F.A. Grasser, A. Flatley, M. Kosters, P.B. Luppa, and P.M. Kramer, *A new strategy for the development of monoclonal antibodies for the determination of human procalcitonin in serum samples*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(2): 989-95.
123. Ceriotti, F., I. Marino, A. Motta, and A. Carobene, *Analytical evaluation of the performances of Diazyme and BRAHMS procalcitonin applied to Roche Cobas in comparison with BRAHMS PCT-sensitive Kryptor*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 2017. **56**(1): 162-169.
124. Heck, H., A. Mader, G. Hess, S. Mucke, R. Muller, and W. Hollmann, *Justification of the 4-mmol/l lactate threshold*. Int J Sports Med, 1985. **6**(3): 117-30.
125. Binder, S. and J.A. Isler, *Chapter 2.8 - Detection of Antibodies Relevant to Infectious Disease*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. 149-155.
126. He, J., *Chapter 5.1 - Practical Guide to ELISA Development*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. 381-393.
127. Mora, J., A. Given Chunyk, M. Dysinger, S. Purushothama, C. Ricks, K. Osterlund, and V. Theobald, *Next generation ligand binding assays-review of emerging technologies' capabilities to enhance throughput and multiplexing*. AAPS J, 2014. **16**(6): 1175-84.
128. Rissin, D.M., C.W. Kan, L. Song, A.J. Rivnak, M.W. Fishburn, Q. Shao, T. Piech, E.P. Ferrell, R.E. Meyer, T.G. Campbell, D.R. Fournier, and D.C. Duffy, *Multiplexed single molecule immunoassays*. Lab Chip, 2013. **13**(15): 2902-11.
129. Dupont, N.C., K. Wang, P.D. Wadhwa, J.F. Culhane, and E.L. Nelson, *Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants*. J Reprod Immunol, 2005. **66**(2): 175-91.
130. Elshal, M.F. and J.P. McCoy, *Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA*. Methods, 2006. **38**(4): 317-23.
131. Cao, E., Y. Chen, Z. Cui, and P.R. Foster, *Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions*. Biotechnol Bioeng, 2003. **82**(6): 684-90.
132. Kleiner, G., A. Marcuzzi, V. Zanin, L. Monasta, and G. Zauli, *Cytokine levels in the serum of healthy subjects*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**. 434010.
133. Jekarl, D.W., J.Y. Kim, J.H. Ha, S. Lee, J. Yoo, M. Kim, and Y. Kim, *Diagnosis and Prognosis of Sepsis Based on Use of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors*. Dis Markers, 2019. **2019**. 1089107.
134. Kim, H., h.-s. Kim, J.-C. Youn, E.-C. Shin, and S. Park, *Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays*. Journal of translational medicine, 2011. **9**. 113.
135. Walz, J.M., D. Boehringer, H.L. Deissler, L. Faerber, J.C. Goepfert, P. Heiduschka, S.M. Kleeberger, A. Klettner, T.U. Krohne, N. Schneiderhan-Marra, F. Ziemssen, and A. Stahl, *Pre-Analytical Parameters Affecting Vascular Endothelial Growth Factor Measurement in Plasma: Identifying Confounders*. PLoS One, 2016. **11**(1). e0145375.
136. Banks, R.E., *Measurement of cytokines in clinical samples using immunoassays: problems and pitfalls*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2000. **37**(2): 131-82.
137. Snider, R.H., Jr., E.S. Nylén, and K.L. Becker, *Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization*. J Investig Med, 1997. **45**(9): 552-60.
138. Fortunato, A., *A new sensitive automated assay for procalcitonin detection: LIAISON® BRAHMS PCT® II GEN*. Practical Laboratory Medicine, 2016. **6**: 1-7.
139. Faude, O., W. Kindermann, and T. Meyer, *Lactate threshold concepts: how valid are they?* Sports Med, 2009. **39**(6): 469-90.

140. Baum, M., M. Muller-Steinhardt, H. Liesen, and H. Kirchner, *Moderate and exhaustive endurance exercise influences the interferon-gamma levels in whole-blood culture supernatants*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1997. **76**(2): 165-9.
141. Lira, F.S., T. Dos Santos, R.S. Caldeira, D.S. Inoue, V.L.G. Panissa, C. Cabral-Santos, E.Z. Campos, B. Rodrigues, and P.A. Monteiro, *Short-Term High- and Moderate-Intensity Training Modifies Inflammatory and Metabolic Factors in Response to Acute Exercise*. Front Physiol, 2017. **8**. 856.

## 8 Lebenslauf



## 9 Liste der Publikationen

- Gopfert, J. C., A. Reiser, V. A. Carcamo Yañez, A. Pohle, U. Wessels, A. Heine, T. O. Joos, C. Petit-Frere, E. Nogoceke, and K. G. Stubenrauch. "Development and Evaluation of an Ultrasensitive Free VEGF-A Immunoassay for Analysis of Human Aqueous Humor." *Bioanalysis* 11, no. 9 (2019): 875-86. <http://dx.doi.org/10.4155/bio-2019-0044>
- Carcamo Yañez, V. A., J. C. Gopfert, M. Otto, H. Tumani, A. Peter, and T. O. Joos. "Development and Validation of an Ultrasensitive Procalcitonin Sandwich Immunoassay." *High Throughput* 6, no. 4 (2017). <http://dx.doi.org/10.3390/ht6040018>
- Muller, S., O. Preische, J. C. Gopfert, V. A. C. Yañez, T. O. Joos, H. Boecker, E. Duzel, P. Falkai, J. Priller, K. Buerger, C. Catak, D. Janowitz, M. T. Heneka, F. Brosseron, P. Nestor, O. Peters, F. Menne, C. G. Schipke, A. Schneider, A. Spottke, K. Fliessbach, I. Kilimann, S. Teipel, M. Wagner, J. Wiltfang, F. Jessen, and C. Laske. "Tau Plasma Levels in Subjective Cognitive Decline: Results from the Delcode Study." *Sci Rep* 7, no. 1 (2017): 9529. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08779-0>
- Loffler, M. W., P. A. Chandran, K. Laske, C. Schroeder, I. Bonzheim, M. Walzer, F. J. Hilke, N. Trautwein, D. J. Kowalewski, H. Schuster, M. Gunder, V. A. Carcamo Yañez, C. Mohr, M. Sturm, H. P. Nguyen, O. Riess, P. Bauer, S. Nahnsen, S. Nadalin, D. Zieker, J. Glatzle, K. Thiel, N. Schneiderhan-Marra, S. Clasen, H. Bosmuller, F. Fend, O. Kohlbacher, C. Gouttefangeas, S. Stevanovic, A. Konigsrainer, and H. G. Rammensee. "Personalized Peptide Vaccine-Induced Immune Response Associated with Long-Term Survival of a Metastatic Cholangiocarcinoma Patient." *J Hepatol* 65, no. 4 (2016): 849-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.06.027>
- Blank, G., C. Welker, J. Haarer, M. Sterk, S. Nadalin, V. A. Yañez, T. O. Joos, A. Menrad, D. Snell, G. LaCorcia, A. Konigsrainer, R. Handgretinger, and K. Schilbach. "Selective, Efficient Modulation of Activated Cd4+ Alphanbetat Cells by the Novel Humanized Antibody Gz-Alphanbetatcr Targeting Human Alphanbetatcr." *Bone Marrow Transplant* 50, no. 3 (2015): 390-401. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2014.263>