

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil I: Kurzbericht

Verbundprojekt: Diagnostischer Test für die rationale Antibiotika-Therapie-Kontrolle (DiabKON)

Teilprojekt: Erforschung und Realisierung von individuellen Stabilisierungslösungen für alle Biokomponenten der Liganden-Assays

Förderprogramm: KMU-innovativ: Medizintechnik

Förderkennzeichen: 13GW0354C

Durchgeführt von: CANDOR Bioscience GmbH
Simoniusstraße 39
88239 Wangen

Projektlaufzeit: 01.06.2019 - 31.05.2023

Projektleiter: Rauch, Peter, Dr.

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) unter dem Förderkennzeichen 13GW0354C gefördert.

Die Verantwortung für den Inhalt der Veröffentlichung trägt der Autor.

Autor(en):

Dr. Carina Vogt und Dr. Peter Rauch, CANDOR Bioscience GmbH

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung

Wissenschaftlich-technisches Arbeitsziel des „DiabKON“ Verbundprojekts war die Erforschung und Realisierung von neuartigen Liganden-Tests für das TDM (therapeutisches Drug Monitoring) von Antibiotika (Liganden-Tests für die Konzentrationsmessungen von Antibiotika).

Ziel des Teilprojektes der CANDOR Bioscience GmbH war die Erforschung und Realisierung individueller Stabilisierungslösungen für die in den Liganden-Test-Kits enthaltenen Biokomponenten sowie eines individuellen Probenverdünnungspuffers zur Minimierung von Interferenzen aus der Realprobe, um die Mindesthaltbarkeiten von mindestens 1 bis 2 Jahren sowie präzise Ergebnisse der Assays zu ermöglichen.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Therapeutisches Drug Monitoring mit Individualisierung von Dosisregimes ist nach wie vor für die meisten Antibiotika nur in wenigen größeren Zentren vorhanden und erfordert i. d. R. aufwendige Analysemethoden, wie z. B. LC-MS/MS, einen hohen Personaleinsatz sowie hoch qualifiziertes Personal. Zusätzlich sind die Richtigkeit und Zuverlässigkeit vom Anwender abhängig. Meist stehen weder die teuren Gerätschaften, noch das entsprechend geschulte Personal in kleinen oder mittleren Laboratorien oder Krankenhauslaboratorien zur Verfügung, sodass TDM von solchen Antibiotika bisher in keiner Weise flächendeckend angeboten wird.

Es existieren immunologische Tests gegen Aminoglykoside und Glykopeptide, und ein TDM dieser Substanzen wird bei entsprechender Indikation routinemäßig weitgehend flächendeckend durchgeführt, auch wenn durch ausbleibende Anpassung an Referenzmethoden eine hohe Variation in den Wertelagen von Tests verschiedener Hersteller zu finden ist. Zur Konzentrationsmessung für die hier betrachteten Antibiotika existieren dagegen noch keine Tests.

Die Stabilisierung von Assaykomponenten ist ein wesentlicher Faktor für kommerzialisierbare diagnostische Test-Kits. Nicht-stabilisierte Assays sind nur wenige Tage bis wenige Wochen haltbar, da Proteine zeitabhängig denaturieren und so ihre Funktionalität verlieren. Zu realisieren sind aber Haltbarkeiten von 1-2 Jahren, in denen die diagnostischen Kits mit vergleichbarer Qualität funktionieren müssen wie frisch hergestellte Kits. Stabilizer von CANDOR kommen in unterschiedlichsten diagnostischen Kits in der human- und Veterinärdiagnostik, aber auch in Assays von Biomarkergruppen im Pharmabereich zum Einsatz.

3. Ablauf des Vorhabens

Zur Untersuchung und Ausarbeitung geeigneter Stabilisierungslösungen und Probenpuffer wurden CANDOR von den Projektpartnern die Biokomponenten für die Assays übergeben.

Es wurden unterschiedliche Stabilisierungslösungen und Blockierungslösungen ermittelt, untersucht und anhand der Modellassays überprüft. Weiterhin wurde die Stabilität untersucht und Langzeittests durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Probenverdünnungspuffer zur Minimierung von Störeffekten, Kreuzreaktivitäten und endogenen Maskierungseffekten anhand von Realproben und Proben mit humanem Serum, dem das jeweilige Antibiotikum zugesetzt worden war (Spiking), untersucht.

Die Puffer wurden kontinuierlich an DRG zur weiteren Testung und Validierung übergeben.

4. Wesentliche Ergebnisse

Im Projekt konnten für folgende von DRG realisierte Ligandentests erfolgreich Puffer zur Realisierung erforderlichen der Haltbarkeit und Zuverlässigkeit der Tests, bereitgestellt werden:

- Ciprofloxacin
- Piperacillin
- Linezolid
- Vancomycin
- Ceftazidime.

Die ausgewählten Puffer und Stabilisierungslösungen sind in das Qualitätssystem der CANDOR Bioscience GmbH überführt worden und werden gemäß den Anforderungen des zertifizierten Qualitätssystems der CANDOR (DIN EN ISO 13485:2016, DIN EN ISO 9001:2015) produziert.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

CANDOR Bioscience arbeitet eng mit dem Partnern innerhalb des Verbundes, insbesondere dem Konsortialführer DRG Instruments, zusammen.

Im Rahmen des FuE-Projektes fand zudem eine Zusammenarbeit mit dem BioLAGO e.V. – life science network statt. BioLAGO wurde über die erreichten Projektfortschritte auf dem Laufenden gehalten und unterstützt das Konsortium bei der Außen- und Pressearbeit des Projektes.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil II: Eingehende Darstellung

Verbundprojekt: Diagnostischer Test für die rationale Antibiotika-Therapie-Kontrolle (DiabKON)

Teilprojekt: Erforschung und Realisierung von individuellen Stabilisierungslösungen für alle Biokomponenten der Liganden-Assays

Förderprogramm: KMU-innovativ: Medizintechnik

Förderkennzeichen: 13GW0354C

Durchgeführt von: CANDOR Bioscience GmbH
Simoniusstrasse 39
88239 Wangen

Projektlaufzeit: 01.06.2019 - 31.05.2023

Projektleiter: Rauch, Peter, Dr.

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) unter dem Förderkennzeichen 13GW0354C gefördert.

Die Verantwortung für den Inhalt der Veröffentlichung tragen die Autoren.

Autor(en):

Dr. Carina Vogt und Dr. Peter Rauch, CANDOR Bioscience GmbH

Inhaltsverzeichnis

1.	Ergebnisse des Projekts	4
2.	Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	20
3.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten	20
4.	Voraussichtlicher Nutzen / Verwertbarkeit der Ergebnisse	20
5.	Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen	20
6.	Veröffentlichung der Ergebnisse	20

1. Ergebnisse des Projekts

AP 3.1: Untersuchung und Etablierung von Modellassays für die Erforschung von geeigneten Stabilisierungslösungen für alle im Kit verwendeten Biokomponenten (Antikörper, Fängerpeptide, Standards der Antibiotika, und Konjugate/Tracer)

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes fand eine enge fachliche Abstimmung und Planung der Projektarbeiten in Form von Telefonaten und Projekttreffen mit den Projektpartnern statt.

Darüber hinausgehend wurde bei CANDOR eine umfangreiche Recherche bezüglich kommerziell erhältlicher Antibiotika und zugehöriger Biokomponenten durchgeführt. Diese Recherche konnte erfreulicherweise erfolgreich mit der Identifikation von in den USA ansässigen Unternehmen abgeschlossen werden, die in der Lage sind, Biokomponenten für die Antibiotikawirkstoffe Ciprofloxacin und Piperacillin zu liefern. Nachfolgend aufgelistete Biokomponenten und Stoffe wurden über das in den USA ansässige Partnerunternehmen der DRG Instruments GmbH bestellt:

- Anti-Ciprofloxacin-AK (mouse); Creative Diagnostics #HMABPY064
- Ciprofloxacin-HRP, Squarix Biotechnology; CHR-8127
- Ciprofloxacin-BSA, Squarix Biotechnology; CBS-8127
- Ciprofloxacin powder; Sigma #17850-259
- Anti-Piperacillin-AK; MyBiosource #MBS355841
- Piperacillin-BSA; Squarix Biotechnology #CBS-8154
- Piperacillin-HRP; Squarix Biotechnology #CHR-8154
- Piperacillin powder; Sigma #PHR1805

Die durch das Projektkonsortium beschafften Biomaterialien wurden an CANDOR übergeben. Diese bildeten die Grundlage für die Untersuchung und den Aufbau zugehöriger Modellassays. Im ersten Schritt wurden für die folgenden Biomaterialien Modellassays, meist in den Formaten „Antigen-Coating“ und Antikörper-Coating“, aufgebaut und untersucht:

1. Ciprofloxacin - Zwei Formate: Antigen-Coating und Antikörpercoating
2. Piperacillin - Zwei Formate: Antigen-Coating und Antikörpercoating
3. Linezolid - Zwei Formate: Antigen-Coating und Antikörpercoating
4. Ceftazidim - Ein Format: Antigen-Coating

Es handelte sich somit um 7 Formate, die die Grundlage für die nachfolgenden Forschungsarbeiten zur Stabilisierung darstellten. Diese Assays wurden auf Grundlage von

Antikörper-basierenden Nachweisen aufgebaut. Peptide, die als Ersatz für Antikörper eingesetzt werden könnten, konnten nicht an CANDOR übergeben werden.

Im Projektjahr 2022 wurden die Biokomponenten für den Meropenem- und den Vancomycin-Assay übergeben. Da Meropenem-HRP und Vancomycin-HRP jedoch nicht zur Verfügung standen, konnten nur Assays im AG-Coating Format ausgearbeitet werden. Die weitere Ausarbeitung der ursprünglich geplanten Assays für Cefepim wurde im Projektverlauf durch DRG unterbrochen, da hier weder kommerzielle Antikörper verfügbar waren noch durch Immunisierung (Fremdaufträge) Antikörper generiert werden konnten. Als Kompensation für Cefepim wurden daher Tests gegen Ampicillin aufgenommen.

2022 wurden folgende Formate ausgearbeitet:

5. Vancomycin – Ein Format: Antigen-Coating
6. Meropenem – nicht möglich

Für Meropenem wurden Biokomponenten von DRG an CANDOR übergeben. Da kein Meropenem-HRP zur Verfügung stand, konnte jedoch nur das AG-Coating-Format aufgebaut werden. Das Protokoll von DRG konnte bei CANDOR nicht reproduziert werden, bei uns fand keine Kompetition durch den Standard statt. Da bei DRG der Assay funktionierte, wurden bei CANDOR zunächst vereinfachte Modellassays zur Stabilitätstestungen für die BSA-Meropenem gecoatete Platte, für den nicht-konjugierten anti-Meropenem-Antikörper und den HRP-markierten Antikörper entwickelt. Bei diesen vereinfachten Assays wurde kein Standard benötigt. Es wurde in Absprache mit DRG versucht zu klären, warum der von uns gekaufte Standard nicht funktionierte. Meropenem ist ein sehr instabiles Molekül und könnte auf dem Transport beschädigt worden sein. Eine Kompetition war nur mit dem BSA-Meropenem (Lieferung DRG) vorhanden, eine Bindung des Antikörpers an BSA konnte ausgeschlossen werden. Es hat sich herausgestellt, dass der Antikörper das intakte Meropenem nicht erkennt, sondern nur denaturiertes. Das gelieferte BSA-Meropenem war denaturiert, deshalb hat der Antikörper daran gebunden. Der von DRG verwendete Standard war ebenfalls denaturiert und wurde deshalb gebunden. Der neu gekaufte Standard war intakt, er wurde deshalb nicht gebunden. Aus diesem Grund war keine Kompetition vorhanden.

2023 wurde folgendes Format ausgearbeitet:

7. Ampicillin – nicht möglich

Die Biokomponenten für einen Ampicillin-Assay im AG-Format wurden im März 2023 an uns übergeben. Komponenten für einen Assay im AK-Format waren nicht verfügbar. Versuche im AG-Format zeigten eine schlechte Kompetition mit dem Standard Ampicillin. Die Durchführung von Optimierungsversuchen zeigte keinen Erfolg. Es wurden vereinfachte Stabilitätsprüfungen für die BSA-Ampicillin gecoatete Platte, das anti-Ampicillin-HRP-Konjugat und den Ampicillin Standard gestartet. Weitere Untersuchungen von uns und DRG zeigten, dass der Antikörper nur ein Abbauprodukt von Ampicillin, nicht aber den intakten Standard erkennt. Daher erfolgte der Abbruch der Stabilitätsprüfungen. Neue Biokomponenten wurden erst nach Projektende im September 2023 an uns gesendet. Der Assay wird auch nach Projektende weiter untersucht.

Für diese Assays wurden im Projektzeitraum keine Biokomponenten an uns gesendet:

1. Gentamycin

Es konnten keine Biokomponenten für den Aufbau eines Gentamycin-Assays an uns übergeben werden.

2. Cefepim

Es konnten keine Biokomponenten für den Aufbau eines Cefepim-Assays an uns übergeben werden.

AP 3.2 – Erforschung und Realisierung von Stabilisierungslösungen für alle unter AP 3.1 aufgeführten Biokomponenten

Beide Teilarbeitspakete (3.1.1: Tracer und Standards, 3.2.2: Antikörper) wurden bearbeitet. Die nachfolgende Ergebnisdarstellung umfasst beide Teilarbeitspakete.

Es wurden verschiedene Stabilisierungslösungen für die Biomaterialien der Formate erforscht. Die Untersuchungen umfassten unterschiedliche Bestandteile und Konzentrationen dieser Bestandteile. Sie wurden auf Basis der in AP 3.1 realisierten Modellassays durchgeführt. In Summe wurden bei CANDOR 96 Stabilisierungslösungen realisiert. Diese sind nachfolgend aufgelistet:

322 – HRP-Protector protein-free, # 222 – HRP Protector, # 228 – Tracer HRP-Stab,
200 – LowCross HRP, # 220 HRP Protector, # 320 – HRP Protector protein-free,
160 – Liquid Plate Sealer, # 162 – Liquid Plate Sealer plus, # 163 – Liquid Plate Sealer animal-free, # 110 – The Blocking Solution, # 112 – Plate Block, # 113 – Smart Block,
115 BSA Block, # 328 – Tracer HRP-Stab protein-free, # 130 – Antibody Stabilizer TRIS

131 – Antibody Stabilizer PBS, # 936 – HRP-Protector TRIS 3 % BSA, # 225 – HRP-Protector PBS, # 325 – HRP-Protector PBS protein-free, # 330 – Antibody Stabilizer TRIS protein-free, # 331 – Antibody Stabilizer PBS protein-free, # 270 – LowCross HRP-Stab, # 100 – LowCross Buffer, # 102 – LowCross mild, # 302 – LowCross strong protein-free # 180 – Assay Defender,
191220MH-1, # 190719MH-1, # 200331MH-1, # 200407CV-1, # 200407CV-2, # 200407CV-3, # 200407CV-4, # 200407CV-5, # 200407CV-6, # 200407CV-7, # 200424MH-1, # 200619CV-1, # 200616CV-1, # 200616CV-2, # 200616CV-3, # 200616CV-4, # 200616CV-5, # 200622CV-1, # 200622CV-2, # 200622CV-3, # 200622CV-4, # 200622CV-5, # 200930AZ-1, # 201123CV-2, # 201123CV-3, # 201123CV-4, # 210119CV-1, # 210119CV-2, # 210119CV-3, # 210209AZ-1, # 210211AZ-1, # 210222AZ-1, # 210316AZ-1, # 210406AZ-1, # 210406AZ-2, # 210406AZ-3, # 210406AZ-4a, # 210406AZ-4b, # 210406AZ-5a, # 210406AZ-5b, # 210503CV-1, # 210503CV-2, # 220413CV-1, # 220603CH-1, # 220718AH-1, # 220718AH-2, # 220718AH-3, # 220816MH-1, # 220413CV-2, # 220816MH-2, # 220804SE-1, # 221212MH-1, # P2019-22-1, # P2019-22-2, # P2019-22-3, # P2019-22-4, # P2019-22-5, # P2019-22-6, # P2019-22-7, # P2019-22-8, # P2019-22-9, # P2019-22-10, # P2019-22-11, # P2019-22-12, # P2019-22-13, # P2019-22-14, # P2019-22-15, # P2019-22-16, # P2019-22-17, # P2019-22-18,

Diese wurden in Chargengrößen hergestellt, die es einerseits erlaubten, damit die nachfolgend geplanten Haltbarkeitsuntersuchungen durchzuführen und andererseits eine genügende Menge dem Projektpartner DRG Instruments zur dortigen Analyse und Untersuchung zur Verfügung zu stellen.

AP 3.3: Testung der in 3.2 entwickelten Stabilisierungslösungen in den Modellassays auf unerwünschte negative Effekte im Assay (optimales Zusammenspiel der verschiedenen Stabilisierungslösungen für Tracer, Standards und Fängermoleküle)

Über die Modellassays wurde das Zusammenspiel der verschiedenen Puffer- und Stabilisierungslösungen überprüft. Die unter AP 3.2 im ersten Schritt ausgewählten Stabilizer hatten in den jeweiligen Modellassays gut funktioniert und konnten den erforderlichen Messbereich auch in den Modellassays abdecken. In Abhängigkeit vom Assay hatten v.a. der Konjugatverdünnungspuffer und der Standardverdünnungspuffer einen großen Einfluss auf den Standardkurvenverlauf. Die Puffer wurden so ausgewählt, dass die Biokomponenten optimal stabilisiert wurden. Anschließend wurden, falls nötig, die Assaybedingungen angepasst, um eine optimale Standardkurve im erwarteten Messbereich zu generieren.

Überprüfungen mit Realproben konnten dabei zunächst nicht durchgeführt werden, da CANDOR aufgrund der nur begrenzten Verfügbarkeit leider zunächst keine Realproben von den Partnern erhalten hatte. Die Realproben, die im Projekt verfügbar waren, wurden vorwiegend von DRG verwendet. Im Jahr 2021 wurden uns Realproben für Linezolid und Ceftazidime von DRG zur Verfügung gestellt. Im Jahr 2022 wurden uns zusätzlich Realproben von Labor Dr. Brunner für die Analyten Linezolid, Ciprofloxacin und Ceftazidime übergeben. Hier handelte es sich um ausgewählte Proben, die in der Hybrid-/LC-MS-Vergleichsmessung im Labor Dr. Brunner Schwierigkeiten, d. h. Falschbestimmungen, bereiteten. Wir vermaßen diese Proben im manuellen ELISA-Kit. Die erforderlichen Kits wurden uns von DRG zur Verfügung gestellt und nach dem vorgegebenen Protokoll durchgeführt. Zusätzlich wurden die Assaybedingungen variiert, z. B. Inkubationszeiten, Probenverdünnungspuffer, Probenverdünnungsfaktor. Die Ergebnisse sind in AP3.6 erläutert.

AP 3.4 – Wissenschaftliche Durchführung von Langzeittests

Die realisierten Stabilisierungslösungen wurden ausgelagert bei Temperaturen von 4 °C (Kühlschrank), Raumtemperatur und 40 °C. Während des Projekts wurde die Temperatur auf Wunsch von DRG von 37 °C auf 40 °C erhöht. Hintergrund waren hier regulatorische Bestimmungen aus der IVD-Verordnung, da die benannte Stelle hier 40 °C verlangt.

Es fand eine turnusmäßige Überprüfung der Eigenschaften der Stabilisierungslösungen statt, auf deren Basis die Haltbarkeit bewertet wurde. Es wurde stets ein Vergleich zu einem frisch hergestellten Assay (Platte, Standard, Konjugat) durchgeführt.

Das Arbeitspaket war im Berichtszeitraum 2020 begonnen worden und wurde für die Analyten Vancomycin, Linezolid und das Ciprofloxacin bis ins Jahr 2023 fortgesetzt.

Ciprofloxacin

Der Langzeitstabilitätstest des Kits für Ciprofloxacin lief über 652 Tage. Mit dem Konjugatverdünnungspuffer #322 HRP Protector protein-free, dem Standardverdünnungspuffer #100 LowCross und der Plattenpräparation (0,5 µg/ml anti-Ciprofloxacin-AK in Coating pH 7,4, 1x waschen, LPS animal-free unverdünnt 2 h) war der Kit bei 4 °C länger als 652 Tage stabil, d. h. er zeigte eine Restaktivität über 80 % und eine Kompetition durch den Standard. Bei RT Lagerung wurde eine Stabilität von 275 Tagen erreicht. Bei 40 °C Lagerung sank die Stabilität auf 30 Tage.

Piperacillin

2022 wurde der Langzeittest des Kits für das Piperacillin (AG-Format, T526) beendet. Für den Piperacillin-Test wurden zwei unterschiedliche Assay-Varianten mit unterschiedlichen

Konjugatverdünnungspuffern und Konjugatkonzentrationen hergestellt. Die gecoatete Platte, das Konjugat und die Standardverdünnungen wurden am Starttag präpariert und bei 40 °C, Raumtemperatur und 4 °C gelagert. Bei 40 °C nahmen die Signale bereits nach 33 Tagen Lagerung ab. Bei 4 °C waren alle Kit-Komponenten über 526 Tage stabil. Die Standardkurven an den unterschiedlichen Messtagen unterschieden sich nicht signifikant.

Linezolid

Alle Kit-Komponenten (Platte, Konjugat, Standard) waren bei 4 °C und bei Raumtemperatur für 370 Tage stabil – es waren keine Unterschiede zwischen den Konjugatverdünnungspuffern #322 HRP Protector protein-free und #328 Tracer HRP Stab protein-free vorhanden. Bei der 40 °C Lagerung war eine Stabilität von 42 Tagen mit Restaktivitäten von 80 % vorhanden. Bei 40 °C stabilisierte der Puffer #322 HRP Protector protein-free besser als der Puffer #328 Tracer HRP Stab protein-free. Die Stocklösung von BSA-Linezolid und/oder dem Konjugat war bei – 20 °C Lagerung nicht stabil. Die Signale des frisch gecoateten Streifens mit dem frisch verdünnten Standard und Konjugat nahmen ab.

Vancomycin

Für das Vancomycin (AG-Format) wurde der Test 2023 gestartet, er läuft über das Projektende hinaus bis 2024 weiter. Die Platte und das Konjugat werden bei 4 °C, Raumtemperatur und 40 °C gelagert. Der Standard wird bei 4 °C und bei Raumtemperatur gelagert, bei 40 °C ist er nicht stabil. Im August 2023 wurde die Stabilität nach 184 Tagen überprüft. Hier waren die Platte, der Standard und das Konjugat bei allen getesteten Temperaturen stabil. Es wird stets eine frisch gecoatete Platte mit frisch verdünntem Konjugat und Standard mitvermessen. Hier war ein Signalabbau zu sehen. Das bei – 20 °C gelagerte BSA-Vancomycin und/oder das bei – 20 °C gelagerte Konjugat waren nicht stabil.

Ceftazidim

Für das Ceftazidim wurde kein Langzeittest gestartet, da CANDOR nicht genügend Material zum Ansetzen des Tests zur Verfügung stand.

Ergebnisse der Stabilitätstestungen Ciprofloxacin

Konjugat AK-Format (Ciprofloxacin-HRP): Es eigneten sich einige Puffer zur Stabilisierung des kommerziell verfügbaren Konjugates Ciprofloxacin-HRP. Die Stabilität blieb dabei über 547 Tage bei 37 °C und 4 °C Lagerung erhalten – es konnte eine Restaktivität über 80 % gezeigt werden. Die beste Stabilität wurde mit den Puffern #322 HRP Protector protein-free und #222 HRP Protector erzielt. Darüber hinaus konnten auch weitere Puffer empfohlen

werden: # 270 LowCross HRP-Stab, # 330 Antibody Stabilizer Tris protein-free, # 228 Tracer HRP Stab, # 320 HRP Protector Tris protein-free.

Konjugat AG-Coating Format (anti-Ciprofloxacin-AK-HRP): Sowohl mit #228 Tracer-HRP-Stab als auch mit P2019-22-3 konnten die Signale bei 188 Tagen Lagerung bei 4 °C und 37 °C gut über 80 % des Starttages gehalten werden. Beim #228 Tracer HRP-Stab konnten bei 364 Tagen Lagerung der Detektorverdünnung bei 4 °C noch 89,55 % des Startsignals erreicht werden.

Standard (natives Ciprofloxacin): Es eigneten sich alle getesteten Puffer zur Stabilisierung des Standards. Ciprofloxacin war in allen Puffern sehr stabil und tolerierte auch eine Lagerung bei höheren Temperaturen (37 °C). DRG hatte #100 LowCross als Standardverdünnungspuffer ausgewählt. Die Testung erfolgte dabei nach 371 Tage bei 37 °C und nach 554 Tagen bei 4 °C.

Plattenstabilitätstest AG-Coating Format (BSA-Ciprofloxacin Coating): Das BSA-Ciprofloxacin war auf der Platte sehr stabil. Für die Kombinationen #110 Blocking Solution-#160 Liquid Plate Sealer und #115 BSA-Block- #162 LPS+ konnten nach 581 Tagen Lagerung sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C B/B0-Werte von über 80 % ermittelt werden.

Plattenstabilitätstest AK-Coating Format (anti-Ciprofloxacin-AK Coating): Eine Stabilisierung mit #160 Liquid Plate Sealer, #162 Liquid Plate Sealer Plus oder #163 Liquid Plate Sealer animal-free war nötig. Ohne eine Stabilisierung nahm die Signalstärke und somit die Ciprofloxacin-Bindung schnell ab. Eine zusätzliche Blockierung mit #110 Blocking Solution oder #113 Smart Block verbesserte die Stabilisierung der Platte nicht. Die höchste Plattenaktivität nach 1,5 Jahren Lagerung bei 4 °C und 1 Jahr Lagerung bei 37 °C wurde mit dem #160 Liquid Plate Sealer erreicht. Die Stabilität der anti-Ciprofloxacin-Platten war sehr gut, es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Plate Sealer Varianten vorhanden.

Ergebnisse der Stabilitätstestungen Piperacillin

Konjugat AK-Coating Format (Piperacillin-HRP): Die Stabilisierung reichte für einen kommerziellen Kit nicht aus. Das Piperacillin-HRP Konjugat war nur bedingt haltbar. Eine Lagerung war nur bei 4 °C möglich. Höhere Temperaturen zerstörten die Aktivität sehr schnell. Nach 14 Tagen Lagerung bei 37 °C zeigte das Konjugat in keinem der getesteten Puffer eine Restaktivität über 50 %. Nach 34 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur zeigte das Konjugat in keinem der getesteten Puffer eine Restaktivität über 80 %. Bei 4 °C Lagerung über 4 bis 6 Monate war die Restaktivität des Konjugates in allen Puffern auf unter 80 % gesunken.

Nach 9 Monaten Lagerung bei 4 °C zeigten die Puffer 200619CV-1, P2019-22-3, 200616CV-3, # 328, 200616CV-5 und P2019-22-1 die höchsten Restaktivitäten von 55 bis 67 %. Die beste Stabilität zeigte der Puffer P2019-22-1.

anti-rabbit Kaninchenserum rb14/20 (AG-Format; als Primär-AK): Der polyklonale native Rabbit-anti-Piperacillin Antikörper, der ungereinigt als Serum vorlag, war bei einer Lagerung bei 4 °C in allen in diesem Versuch eingesetzten Puffern für 645 Tage ohne Funktionsverlust stabil. Bei 37 °C war er für 182 Tage stabil. Der Antikörper war als nicht-aufgereinigtes Serum für den Einsatz im Piperacillin-Assay geeignet. Zukünftig soll jedoch ein direkt HRP-markierter anti-Piperacillin-Antikörper eingesetzt werden. Dies hätte den Vorteil, dass der Inkubationsschritt sowie die Stabilisierung des Sekundärantikörpers wegfallen würde.

Konjugat AG Format (anti-Piperacillin-AK-HRP): Um die Assay-Durchführung zu erleichtern, wurde der anti-Piperacillin-Antikörper direkt mit Peroxidase konjugiert. DRG stellte uns den konjugierten, aufgereinigten Antikörper für die Entwicklung des Antigenformates zur Verfügung. Das anti-Piperacillin-HRP-Konjugat wurde in 18 unterschiedlichen Puffern bei 40 °C für 202 Tage und bei 4 °C für 391 Tage gelagert. Die Stabilizer #222 HRP-Protector, #320 HRP-Protector TRIS protein-free, #328 Tracer-HRP Stab protein-free, #130 Antibody Stabilizer TRIS, #131 Antibody Stabilizer PBS, #270 LowCross-HRP Stab sowie der B-Stab zeigten in diesem Versuch bei einer Lagertemperatur von 4 °C für 202 Tage bzw. bei einer Lagertemperatur von 40 °C für 125 Tage keinen Aktivitätsverlust. Nach 391 Tagen bei 4 °C bzw. 202 Tagen bei 40 °C zeigte das Konjugat in den Puffern #222 HRP Protector und #328 Tracer HRP Stab protein-free keinen Aktivitätsverlust. Das StabilZyme zeigte in diesem Versuch deutlich schlechtere Ergebnisse als die oben genannten Stabilizer von CANDOR.

Standard (natives Piperacillin): Das native Piperacillin war nur in den Puffern # 228 Tracer HRP Stab, 200424MH-1 und # 328 Tracer HRP Stab protein-free stabil, in den anderen getesteten Puffern war es wesentlich instabiler, v. a. bei höheren Temperaturen (RT, 37 °C). Die Stabilität war in den o. g. Puffern sehr gut und über 1,5 Jahre bei RT gegeben. Das Piperacillin kann in einem kommerziellen Kit als ready-to-use Lösung eingesetzt werden, wenn einer der drei CANDOR-Puffer verwendet wird.

Plattenstabilitätstest AK-Coating Format (anti-Piperacillin-AK/Serum; anti-rabbit-IgG Undercoat): Die verschiedenen Plattenpräparationen zeigten unterschiedlich hohe absolute OD-Werte am Starttag. Alle stabilisierten Platten zeigten eine gute Stabilität über 1 Jahr bei einer Lagerung bei 4 °C. Am letzten Messtag T547 sanken die Aktivitätswerte auf 71 – 78 % im Vergleich zum Starttag T0. Es waren keine Unterschiede in der Stabilität zwischen den unterschiedlichen Protokollen zu sehen. Die nicht stabilisierte Platte verlor sehr schnell die Fähigkeit, das Piperacillin-HRP-Konjugat zu binden. Eine Stabilisierung mit einer der Liquid Plate Sealer Varianten war notwendig. Es machte keinen Unterschied, ob nur mit dem

Undercoat anti-rabbit-IgG immobilisiert oder ob mit dem Undercoat und dem spezifischen Fänger-AK gleichzeitig über Nacht immobilisiert wurde. Auch das Waschen zwischen den Inkubationsschritten hatte keinen Einfluss auf die Stabilisierung der Platte, ebenso wenig wie die unterschiedlichen Liquid Plate Sealer Varianten. Auch eine Blockierung mit der #110 Blocking Solution hatte keinen Einfluss auf die Stabilisierung der Platte. Alle stabilisierten Platten zeigten nach 6 Monaten Lagerung bei 37 °C noch Bindeaktivitäten über 80 % im Vergleich zum Starttag T0.

Plattenstabilitätstest AG-Format (BSA-Piperacillin): Die immobilisierte Piperacillin-BSA Konzentration von 0,1 µg/ml konnte mit allen getesteten Blockierungs- und Stabilisierungsverfahren für 1 Jahr bei 4 °C stabilisiert werden. Auch nach der 93-tägigen Lagerung bei 37 °C konnte keine Signalabnahme beobachtet werden. Die Wahl des Coating Buffers sowie die Durchführung eines Waschschrittes nach der Immobilisierung und vor der Blockierung hatten auf die Stabilisierung des immobilisierten Piperacillin-BSA keinen Einfluss. Für die Immobilisierung konnten sowohl der Coating Buffer pH 7,4 als auch pH 9,6 verwendet werden. Die Blockierung mit dem #113 SmartBlock Buffer schien die Signalstärke im Vergleich zu der Blockierung mit #110 Blocking Solution bzw. dem Blockierungs-/Stabilisierungsschritt mit einer der Liquid Plate Sealer Varianten geringfügig zu drücken. Allerdings konnten auch mit dem #113 SmartBlock sehr gute Kurvenverläufe erzielt werden. Das Piperacillin-BSA war nach den Ergebnissen dieses Stabilitätstests für den Einsatz in einem kommerziellen Assay geeignet.

Ergebnisse der Stabilitätstestungen Linezolid

Konjugat AK-Coating-Format (Linezolid-HRP): Das Linezolid-HRP-Konjugat war bei 4 °C Lagerung in den Puffern #270 LowCross-HRP Stab, #330 Antibody Stabilizer-protein free, #228 Tracer HRP Stab, #328 Tracer HRP Stab protein-free, #322 HRP Protector protein-free und 191220MH-1 über 364 Tage stabil. Bei der 40 °C Lagerung nahmen die Signale in allen Puffern sehr schnell ab, nur im #222 HRP Protector und im #322 HRP Protector protein-free waren nach 177 Tagen Lagerung bei 40 °C noch Signalaktivitäten > 80 % des Starttages vorhanden.

Konjugat AG-Coating Format (anti-Linezolid-AK-HRP): Das anti-Linezolid-Antikörper-HRP- Konjugat war in allen getesteten Stabilizern bei 4 °C Lagerung über 365 Tage stabil mit Signalen über 80 % des Starttages. Bei der 40 °C Lagerung nahmen die Signale in den meisten Stabilizern ab – bei 40 °C Lagerung war das Konjugat nur im #322 HRP Protector protein free und im Stabilzyme 1:2 über 280 Tage stabil mit Signalen über 80 % des Starttages.

Standard (natives Linezolid): Es eigneten sich alle getesteten Puffer zur Stabilisierung des Standards. Linezolid war in allen Puffern sehr stabil und tolerierte auch eine Lagerung bei

höheren Temperaturen (40 °C). Die Testung erfolgte dabei nach 366 Tagen bei 40 °C in 20 unterschiedlichen Puffern.

Plattenstabilitätstest AG-Coating Format (BSA-Linezolid): Die mit BSA-Linezolid gecoateten Platten waren sehr stabil, wenn einer der Liquid Plate Sealer Varianten eingesetzt wurde. Eine zusätzliche Blockierung hatte keinen Einfluss auf die Stabilität der Platte. Nach 379 Tagen Lagerung bei 40 °C wurden B/B0-Werte von über 80 % ermittelt, wenn die Stabilisierung mit dem #160 Liquid Plate Sealer, #163 dem Liquid Plate Sealer animal-free oder dem #162 Liquid Plate Sealer Plus erfolgte. Das von DRG favorisierte Verfahren eignete sich ebenfalls.

Plattenstabilitätstest AK-Coating Format: wurde nicht durchgeführt, da DRG das AG-Format bevorzugte.

Ergebnisse der Stabilitätstestungen Ceftazidime

Konjugat AG-Format (anti-Ceftazidime-AK-HRP): Die Testung wurde mit 9 ng/ml Konjugatkonzentration angesetzt. Während des Tests führte DRG eine Optimierung und Anpassung der Kalibrationskurve mit geänderten Konjugat- und Standardkonzentrationen durch. Der Konjugatverdünnungspuffer hatte einen großen Einfluss auf den Kurvenverlauf. DRG hatte für die Optimierungen das verdünnte Stabilzyme verwendet und war mit der Stabilisierung dieses Stabilizers von Surmodics zufrieden. Deshalb wurden unsere Testungen abgebrochen. Aus diesem Grund konnte von uns kein geeigneter Stabilizer für das Konjugat festgelegt werden.

Konjugat AK-Format: wurde nicht durchgeführt

Standard (natives Ceftazidime): Der Standard natives Ceftazidime war als ready-to-use-Lösung nicht stabil. Aus diesem Grund musste ein Puffer gefunden werden, in dem die Standardlösungen zunächst lyophilisiert werden konnten. Nach dem Lösen des Lyophilisates mussten die Standards 21 Tage bei 4 °C stabil bleiben. Hierfür eigneten sich folgende Puffer: Na-Phosphatpuffer pH 5,5 + 1% BSA, BSA-Block pH 6 und die beiden Sample Buffer Varianten pH 6 und pH 5,5. Die Testung der Lyophilisate und der aufgelösten Lyophilisate erfolgte bei DRG.

Plattenstabilität AG-Coating Format (BSA-Ceftacidime): Die Plattenstabilität wurde über 557 Tage bei 4 °C und 40 °C getestet. Nur der #160 Liquid Plate Sealer zeigte nach 185 Tagen bzw. 557 Tagen eine Signalintensität von über 80 % bei 4 °C Lagerung bzw. 74 % bei 40 °C Lagerung. Alle anderen Plattenpräparationen zeigten deutlich schlechtere Stabilitäten.

Plattestabilität (AK-Format): wurde nicht durchgeführt

Ergebnisse der Stabilitätstestungen Vancomycin

Konjugat AK-Format: Nicht möglich, da kein Vancomycin-HRP zur Verfügung stand.

Konjugat AG-Coating Format (anti-Vancomycin-AK-HRP): Hier wurden 2 Testungen für ein Jahr angesetzt (mit und ohne Standardkompetition). Mache Puffer zeigten eine ungewöhnliche Signalerhöhung im Vergleich zum Starttag. Es eigneten sich die Puffer #322 HRP Protector protein-free (4°C bis T278 Aktivität von 100 %, T369 Restaktivität von 75 %), #222 HRP Protector (4 °C Aktivität bis T278 98 – 106 %; T369 bei 83 %) und Stabilzyme 1:2 (bei 4 °C T 369 88 – 115 %, hier allerdings z.T. Signalanstiege in einzelnen Vials). Bei 40 °C Lagerung war das Konjugat nur im Stabilzyme 1:2 und im #222 HRP Protector über 180 Tage stabil.

Standard (natives Vancomycin): Es wurden 12 Puffer getestet. Bei 40 °C Lagerung nahm die Kompetition im Assay in allen Puffern sehr schnell ab. Der Vancomycin-Standard zeigte eine gute Stabilisierung bei 4 °C in allen getesteten Puffern. Die beste Stabilisierung wurde mit den Puffern 210119CV-3, #228 Tracer HRP Stab, #328 Tracer HRP Stab protein-free und P2019-22-5 erreicht. Evtl. muss der Standard im Assay lyophilisiert werden, dies kann nur bei DRG getestet werden. Dafür eignen sich v.a. die Puffer #228 Tracer HRP stab, #328 Tracer HRP Stab pf und P2019-22-5.

Plattenstabilitätstest AG-Coating Format (BSA-Vancomycin): Es wurden 11 unterschiedliche Plattenpräparationen mit und ohne zusätzliche Blockierung für ein Jahr getestet. Am besten stabilisierte der #163 LPS animal-free. Eine zusätzliche Blockierung hatte keinen positiven Effekt auf die Stabilität der Platten: die #110 Blocking Solution verringerte die Stabilität und der #113 Smart Block und der #115 BSA Block veränderten die Stabilität nicht. Das DRG Standardprotokoll mit Waschen und 1:2 Verdünnung des #163 LPS af konnte verwendet werden. Es stabilisierte die Platte sehr gut. Der Waschschritt könnte auch weggelassen werden. Der #163 LPS af könnte auch unverdünnt verwendet werden.

Plattenstabilitätstest AK-Coating Format: nicht möglich, da kein Vancomycin-HRP zur Verfügung stand.

Ergebnisse der Stabilitätstestungen Meropenem

Konjugat AK-Format: Nicht möglich, da kein Meropenem-HRP zur Verfügung stand.

Konjugat AG-Coating Format (anti-Meropenem-AK/Anti-Meropenem-AK-HRP): Testung der Stabilität des nicht-konjugierten anti-Meropenem-Antikörpers und des konjugierten anti-Meropenem-HRP-Antikörpers. Die Testungen wurden im September 2022 gestartet und für

das konjugierte Konjugat wurden zwei Stabilitätstestungen mit 12 bzw. 15 Puffern angesetzt. Die Konjugate wurden bei 4 °C und 40 °C gelagert. Die Testungen wurden im April 2023 abgebrochen, da der Antikörper nur denaturiertes Meropenem erkennt – das intakte Antibiotikum wird nicht erkannt. Der Antikörper eignet sich nicht für den Assay.

Standard (natives Meropenem): Nicht möglich, da der von uns gekaufte Standard keine Kompetition zeigte. Der Grund dafür ist, dass der Antikörper nur das Abbauprodukt von Meropenem erkennt.

Plattenstabilitätstest AG-Coating Format (BSA-Meropenem): Die BSA-Meropenem Plattenstabilitätstestung wurde im Juli 2022 gestartet und im April 2023 abgebrochen. Der Antikörper erkennt nur das Abbauprodukt des Meropenems. BSA-Meropenem, das wir von DRG erhalten hatten, war schon bei der Lieferung denaturiert und wurde deshalb vom Antikörper erkannt. Ein Plattenstabilitätstest, bei dem bereits denaturiertes Antigen immobilisiert wurde, kann nicht verwendet werden.

Plattenstabilitätstest AK-Coating Format: Nicht möglich, da kein Meropenem-HRP zur Verfügung stand.

Ergebnisse der Stabilitätstestungen Ampicillin

Es erfolgte ein Abbruch aller Stabilitätstests nach Meldung vom Partner DRG, dass der Antikörper nur die denaturierte Form des Ampicillin erkennt.

AP 3.5 - Testung verschiedener Blockierungslösungen

Es wurden unterschiedliche Blockierungslösungen untersucht.

Ciprofloxacin: Die Ergebnisse der unterschiedlichen Blockierungsformen und -lösungen unterschieden sich nur sehr geringfügig. Auch die verdünnt eingesetzten Varianten der unterschiedlichen Blockierungslösungen zeigten keine merkliche Erhöhung des Hintergrundsignals bzw. Verschlechterung der Blockierungseigenschaften.

Ceftazidim: Der Versuch zeigte, dass der Einsatz des Puffers 210406AZ5a als Standardverdünnungspuffer zu einem geringfügig besseren Signal-Rauschverhältnis führte als eine Verdünnung der Serumstandards in dem Puffer 210503CV-2. Der Einsatz der #110 Blocking Solution in Kombination mit dem Puffer 210406AZ5a zeigte das beste Signal-Rauschverhältnis. Die Kombination aus #115 BSA-Block / #163 Liquid Plate Sealer animal-free und dem 210406AZ5a als Standard-Verdünnungspuffer zeigte ebenfalls ein sehr gutes Signal-Rauschverhältnis.

Piperacillin: Anhand der Ergebnisse aus diesem Versuch schien die von DRG eingesetzte Methode mit verdünntem #163 Liquid Plate Sealer animal-free für die Blockierung der Oberfläche ausreichend zu sein. Aber auch die sequenzielle Blockierung mit dem #163 Liquid Plate Sealer animal-free (unverdünnt) zeigte gute Ergebnisse. Unabhängig davon, dass die sequenzielle Blockierung mit den unterschiedlichen Plate Sealer Varianten deutlich bessere Ergebnisse zeigte als das 1-Schritt-Blockierungsverfahren, bei dem die gewünschte Plate Sealer Variante direkt zu der Immobilisierungslösung hinzu pipettiert wird, zeigte der #163 Liquid Plate Sealer animal-free im Vergleich zu den beiden anderen Plate Sealer Varianten ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis.

Linezolid: Kurvenverläufe, Signal-Rausch-Verhältnisse und die OD-Werte unterschieden sich nur gering. #112 Plate Block und #113 Smart Block drückten die Signale. Mit den Blockierern #110 Blocking Solution und #115 BSA-Block waren die OD-Werte höher und die Performance war vom verwendeten Plate Sealer unabhängig. Der Plattenstabilizer Liquid Plate Sealer und seine Varianten blockierten die Wells ausreichend gut - eine zusätzliche Blockierung war nicht notwendig. Weitere Testungen zur Blockierung sollten nur durchgeführt werden, falls es Probleme mit der Realprobenmessung geben sollte.

Vancomycin: Bei der Plattenstabilitätstestung der BSA-Vancomycin-Platten wurden mehrere Blockierer (BSA-Block, Blocking Solution, Smart Block) in Kombination mit den Liquid Plate Sealer-Varianten getestet. Eine zusätzliche Blockierung hatte keinen positiven Effekt auf die Stabilität der Platten: die #110 Blocking Solution verringerte die Stabilität und der #113 Smart Block und der #115 BSA Block veränderten die Stabilität nicht. Weitere Testungen zur Blockierung sollten nur durchgeführt werden, falls es Probleme mit der Realprobenmessung geben sollte.

Für Meropenem, Ampicillin, Gentamycin und Cefepim standen keine geeigneten Biokomponenten zur Verfügung.

AP 3.6 - Erforschung und Realisierung von Probenverdünnungspuffern zur Minimierung von Störeffekten, Kreuzreaktivitäten und endogenen Maskierungseffekten

In diesem Arbeitspaket wurden Realproben sowie Proben mit humanem Serum, dem das jeweilige Antibiotikum zugesetzt worden war (Spiking), untersucht.

Für die Untersuchungen wurden Realproben zugesendet, die bei der Hybrid-Vergleichsmessung im Labor Dr. Brunner abweichende Ergebnisse geliefert hatten. Wir untersuchten diese Proben mit der manuellen Assaymethode von DRG. DRG stellte uns dafür die nötigen Kits und das Protokoll zur Verfügung. Wir führten die Methode nach den Angaben

durch und veränderten zusätzlich einige Parameter (z. B. Probenverdünnungspuffer, Standardverdünnungspuffer, Inkubationszeit, Faktor der Probenverdünnung).

Ciprofloxacin:

Im ersten Schritt standen keine Realproben zur Verfügung. Das Antibiotikum wurde zu humanem Serum zugesetzt. Es bestand kein Unterschied zwischen #105 Sample Buffer, #100 LowCross und LC/H2O. Es wurde eine Unterbestimmung der gespickten Serumproben mit einer durchschnittlichen Wiederfindung von ca. 70 % beobachtet.

Danach wurden auch Realproben untersucht. Hier konnte keine Verbesserung der Ergebnisse durch Veränderung des Assays herbeigeführt werden. Bei einigen Realproben wurde die Konzentration zu hoch bestimmt. Der Austausch des Probenverdünnungspuffers, der Platte oder der Plattenpräparation (z. B. durch zusätzliche Blockierung, veränderte Stabilisierung) veränderte die Überbestimmung nicht. Es wurden auch höhere Probenverdünnungen getestet. Für die Bestimmung der Probenkonzentrationen in unterschiedlichen Probenverdünnungspuffern wurde je eine Standardreihe in den entsprechenden Puffern hergestellt. Als Proben- und Standardverdünnungspuffer wurden #100 LowCross-Buffer + Reinstwasser (1+1), #180 Assay Defender, #102 LowCross STRONG, #302 LowCross STRONG protein-free und weitere, neue Puffervarianten verwendet. Die Serumproben wurden 120 min im Probenverdünnungspuffer vorinkubiert bzw. frisch verdünnt. Keiner der eingesetzten Probenverdünnungspuffer war in der Lage in Kombination mit unterschiedlichen Platten und Blockierungslösungen die Ciprofloxacin-Werte der Realproben auf das Niveau der Referenzmessung zu drücken. Vermutlich erkannte der Antikörper auch die in der Probe enthaltenen Abbau- und Stoffwechselprodukte des Ciprofloxacins, d. h. es fand eine Kreuzreaktion des immobilisierten Antikörpers mit den Abbauprodukten des Ciprofloxacins statt. Mit der Referenzmethode LC-MS/MS wurde nur das vollständige Ciprofloxacin bestimmt. In der Realprobe befanden sich, v. a. nach längerer Antibiotikagabe, auch die Abbau-/Stoffwechselprodukte. Wenn diese ebenfalls detektiert werden, erhöht sich die gemessene Konzentration (Summe vollständiges und abgebautes Ciprofloxacin). DRG konnte in der Literatur zwei Metabolite ausfindig machen, die als Reinstoffe erhältlich waren und noch eine Wirksamkeit von ca. 60% besaßen. Beide Substanzen wurden von DRG getestet.

Piperacillin:

Hier standen im Projekt keine Realproben zur Verfügung und das Antibiotikum wurde zu humanem Serum zugesetzt. Es wurden mehrere Kombinationen ausprobiert, die Wiederfindung war z. T. ausreichend gut. Es wurden weitere Versuche mit dem konjugierten anti-Piperacillin-HRP durchgeführt. Mit der Kombination #228 Tracer-HRP Stab / Reinstwasser als Probenverdünnungspuffer und #228 Tracer-HRP Stab als Konjugatverdünnungspuffer mit

einer Konjugatkonzentration von 140 ng/ml lagen alle Wiederfindungen ausnahmslos im Bereich von +/- 20%. Auch mit der Pufferkombination #228 Tracer-HRP Stab als Probenverdünnungspuffer und #936 HRP-Protector TRIS 3% BSA als Konjugatverdünnungspuffer mit einer Konjugatkonzentration von 160 ng/ml lagen die meisten Spikekonzentrationen bei Wiederfindungen im Bereich von +/- 30%.

Linezolid:

Zunächst wurden Realproben, die uns DRG zur Verfügung gestellt hatte, vermessen. Die Bestimmung der Realproben war abhängig vom verwendeten Konjugatverdünnungspuffer. Mit den Konjugatverdünnungspuffern # 328 und #228 war die Bestimmung gut. Mit dem Konjugatverdünnungspuffer # 322 war die Bestimmung wesentlich schlechter als mit dem Konjugatverdünnungspuffer # 328. Bei Messungen mit dem Standard in #228 Tracer HRP Stab und dem Probenverdünnungspuffer #228 Tracer HRP Stab wurden die Realproben frisch 1:100 verdünnt und direkt vermessen. Hier wurden 13 Realproben richtig bestimmt (Abweichung < 20%). 3 der 16 Realproben wurden falsch bestimmt, die falschen Bestimmungen waren dabei zu hoch oder zu niedrig. Der Mittelwert über die Wiederfindungsraten war sehr gut und lag bei 96%.

Später hat uns das Labor Dr. Brunner 4 Realproben zugesandt, zwei wurden im Hybrid richtig bestimmt, zwei wurden im Hybrid stark überbestimmt. Bei uns traten die Überbestimmungen im manuellen Assay nicht auf, alle Proben wurden richtig bestimmt – selbst bei Verwendung des DRG Probenverdünnungspuffers und der DRG Standards. Zwischen den beiden Methoden Hybrid und manueller ELISA gibt es Unterschiede in der Assaydurchführung (z.B. Probenverdünnungsfaktor, Probenverdünnungspuffer), diese könnten für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. Die Inkubationszeit von 30 min musste exakt eingehalten werden, um richtige Ergebnisse zu erhalten. Eine gute Bestimmung wurde mit dem Probenverdünnungs- und dem Standardverdünnungspuffer von DRG oder dem Probenverdünnungs- und dem Standardverdünnungspuffer #302 LowCross strong protein-free erreicht. Wenn möglich, sollten Standard und Probe im selben Puffer verdünnt werden. Die verwendete Probenverdünnung ist 1:100. Bei der Hybridmethode erfolgte eine Probenverdünnung von 1:10. Dies könnte zu Störeffekten führen.

Ceftazidim:

Die Ceftazidime Realproben von DRG wurden im Jahr 2021 nicht vermessen. Es wurden Spikingexperimente von Negativseren durchgeführt, die zeigten, dass der Assay noch weiter optimiert werden sollte. Nach Absprache mit DRG wurde die Realprobenvermessung bei uns nicht durchgeführt.

Zur Verbesserung der Realprobenbestimmung der Proben von Labor Dr. Brunner wurden viele Parameter verändert, um die Bestimmung der manuellen Methode zu verbessern: Unterschiedliche Standard- und Probenverdünnungspuffer, Veränderung der Inkubationszeit, der Inkubationstemperatur, der Pipettierreihenfolge. Alles hatte einen großen Einfluss auf die Standardkurven. Bei unseren Messungen im ELISA konnten die Werte aus dem Hybrid nicht bestätigt werden. Die beste Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Referenzmethode LC-MS/MS wurde mit den Standardverdünnungspuffern #100 LowCross Puffer bzw. 220718AH-1 und dem Probenverdünnungspuffer 220718AH-2 erzielt. In diesen Standardverdünnungspuffern war der Standard allerdings nicht stabil. Da sie sich nicht zum Lyophilisieren eignen, können sie im Kit nicht verwendet werden. Die Signale wurden bei Verwendung des LowCross Puffers außerdem gedrückt, dies weist auf eine niedrige Affinität des Antikörpers hin.

Fazit

Die oben beschriebenen Puffer wurden kontinuierlich an DRG zur weiteren Testung und Validierung übergeben. Hier wurde auch die besondere Eignung in dem Hybrid XL-System überprüft. Die ausgewählten Puffer und Stabilisierungslösungen sind in das Qualitätssystem der CANDOR Bioscience GmbH überführt worden und werden gemäß den Anforderungen des zertifizierten Qualitätssystems der CANDOR (DIN EN ISO 13485:2016, DIN EN ISO 9001:2015) produziert.

Für folgende von DRG realisierte Ligandentests konnten somit erfolgreich Puffer bereitgestellt werden:

- Ciprofloxacin
- Piperacillin
- Linezolid
- Vancomycin
- Ceftazidime

Für folgende Liganden konnten im Projektverlauf keine funktionalen Assays entwickelt werden:

- Ampicillin
- Meropenem.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Als wichtigste Kostenpositionen für die Durchführung des Projektes sind Personalkosten für die aufwendigen Arbeiten, gefolgt von Materialkosten und in geringem Maße Abschreibungen und Reisekosten zu nennen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die Notwendigkeit des Projektes folgte aus dem Bedarf an Schnelltests zum quantitativen Nachweis von häufig in der Intensivmedizin eingesetzten Antibiotika für ein geeignetes Therapeutisches Drug Monitoring. Die im Teilprojekt erforschten Stabilisierungslösungen sind ein essentieller Bestandteil des Tests und erforderlich, um diese sicher anwenden zu können.

Die Ausarbeitung der Lösungen erforderte umfangreiche Forschungsarbeiten. Der Aufwand wurde dabei auf den erforderlichen Umfang begrenzt.

4. Voraussichtlicher Nutzen / Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Arbeiten wurden erfolgreich durchgeführt und geeignete Stabilisierungslösungen für die Assays des Partners DRG ausgearbeitet. Die Stabilisierungslösungen kommen in diesen Ligandentests zur Anwendung und stellen sicher, dass diese für den Einsatz im klinischen Alltag geeignet sind.

5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen

Während der Laufzeit wurden keine Ergebnisse Dritter bekannt, die das Vorhaben betrafen.

6. Veröffentlichung der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden vom Projektpartner Labor Dr. Brunner im Rahmen der Konferenz „Diagnostics for Future“ präsentiert. Weitere Veröffentlichungen bzw. Präsentationen sind in Hinblick auf die Vermarktung der Tests durch den Partner DRG vorgesehen.