



Zwei-Fächer-Bachelorstudiengang Biologie / Chemie

Bachelorarbeit

Validierung des automatisierten ELISA – Bearbeitungssystems
in modularer Bauweise (ELISA – Roboteranlage)

Vorgelegt von : Jessica Wigbers
Matrikel Nr. : 9885200

Betreuender Gutachter : Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch
Zweitgutachter : Dr. Lutz Bötcher

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während meines Studiums und bei der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht dabei an meine beiden Korrektoren: Herrn Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch, der mich freundlicherweise in seiner Arbeitsgruppe zur Anfertigung einer außeruniversitären Bachelorarbeit aufgenommen hat, sowie Herrn Dr. Lutz Bötcher, der mir eine so verantwortungsvolle Aufgabe anvertraut und mir diese Arbeit dadurch erst ermöglicht hat.

Danken möchte ich auch dem Veterinärinstitut Oldenburg, LAVES Nds., dass mir mit seiner Aufgeschlossenheit überhaupt erst ein „duales“ Studium ermöglicht hat.

Danken möchte ich weiterhin meinen Kolleginnen und Kollegen der Serologie, insbesondere bei Herrn Willi Jansen, der mir bei der Durchführung der Bachelorarbeit stets hilfreich und kritisch zur Seite gestanden hat und mich durch seine Anregungen immer wieder unterstützt hat.

Auch an die Firma PETERS Technologie geht ein besonderer Dank für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Integration der ELISA-Roboteranlage.

Ein großer Dank geht auch an die Firma IDEXX GmbH, die mir Testmaterial zur Verfügung gestellt hat. Ein besonderer Dank geht hierbei an Frau Katharina Rammelt, die mir viele tiefgreifenden Informationen zur Verfügung gestellt hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann, Frerk Wigbers bedanken, der mir während des Studiums immer den Rücken freigehalten und mich in allen Bereichen stets unterstützt und aufgebaut hat.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Betrieb	1
1.2 DIN EN ISO/IEC 17025 und QM	1
1.3 Fragestellung	2
1.3.1 Test – Beschreibung	2
1.3.2 Validierungsparameter	3
1.3.3 Funktionsweise ELISA – Roboteranlage	4
2 Methoden	5
2.1 Washer	5
2.1.1 Funktionsprinzip	5
2.1.2 Zuordnung der Waschlösungen	5
2.1.3 Überprüfung der Waschprogramme	7
2.1.3.1 Anzahl Waschzyklen	8
2.1.3.2 Befüll- und Absaugkontrolle	9
2.1.4 Reinigung und Wartung	10
2.1.4.1 Soak Prozedur nach definierter Standzeit	10
2.1.4.2 Tägliche Reinigung	10
2.1.4.3 Wöchentliche Reinigung	10
2.1.5 Gesamtergebnis Washer	11
2.2 Dispenser	12
2.2.1 Funktionsweise	12
2.2.2 Funktionstauglichkeitsprüfung der Nadeln	14
2.2.2.1 Reaktion der Reagenzien und Farblösung mit Silikonschläuchen	14
2.2.2.2 Verdünnung der Farbstofflösung	15
2.2.2.3 Funktionstauglichkeitsprüfung	16
2.2.3 Justierung und Kalibrierung	17
2.2.3.1 Justierung	18
2.2.3.2 Kalibrierung	19
2.2.3.3 Diskussion	20
2.2.4 Kontrolle der Dispension	21
2.2.5 Initialvolumen	22
2.2.6 Zuordnung der Reagenzien	23
2.2.7 Reinigung	24
2.2.8 Gesamtergebnis Dispenser	24
2.3 Photometer	25
2.3.1 Kalibrierung	25
2.3.2 Kontrolle Plattenlayout	26
2.3.3 Zuordnung Messprogramm – Test	27
2.3.4 Kontrolle der Messergebnisse	28
2.3.5 Gesamtergebnis Photometer	29
2.4 Testläufe	30
2.4.1 Parallele Abarbeitung definierter Proben manuell – ELISA-Roboteranlage	30
2.4.1.1 IBRgE	31
2.4.1.2 BVD Ag	32
2.4.1.3 Diskussion	33
2.4.2 Ausblick	38

3	Fazit.....	40
	Glossar.....	41
	Literaturverzeichnis.....	44
A.	Anhang A – Erläuterungen und Vorversuche	A-1
1	Assays	A-1
1.1	Prinzip ELISA.....	A-1
1.1.1	Indirekter und Direkter ELISA	A-1
1.1.2	Kompetitiver ELISA.....	A-3
1.2	Testprinzipien.....	A-3
1.2.1	BVD Ag.....	A-3
1.2.2	IBRgB	A-4
1.2.3	IBRgE.....	A-4
1.3	Funktionsprinzip Spektralphotometer.....	A-5
2	Methoden.....	A-5
2.1	Washer.....	A-5
2.2	Dispenser	A-6
2.2.1	Verdünnung der Farbstofflösung.....	A-6
2.2.2	Vorbereitung Analysenwaage.....	A-6
2.2.3	Dichtebestimmung.....	A-6
2.2.3	Zusammenhang OD/Volumen - Versuchsdurchführung.....	A-8
B.	Anhang B – Screenshots und Ergebnistabellen.....	B-1
1	Assays	B-1
1.1	Editionen.....	B-1
1.1.1	BVD Ag.....	B-1
1.1.2	IBRgB	B-2
1.1.3	IBRgE.....	B-3
2	Washer	B-4
2.1	Zuordnung Waschlösung	B-4
2.2	Überprüfung Waschprogramm	B-5
2.2.1	BVD Ag.....	B-5
2.2.2	IBRgB	B-7
2.2.3	IBRgE.....	B-9
2.2.4	Gesamt	B-11
2.2.5	Übersicht Einstellungen Washer.....	B-12
2.2.6	Kontrolle Waschergebnis	B-13
2.3	Befüll- und Absaugkontrolle.....	B-13
2.4	Soak Prozedur nach definierter Standzeit	B-16
2.5	Tägliche Reinigung	B-16
2.6	Wöchentliche Reinigung	B-16
3	Dispenser.....	B-18
3.1	Verdünnung der Farblösung	B-19
3.2	Funktionstauglichkeitsprüfung der Nadeln.....	B-19
3.3	Dispensierverhalten der Nadeln.....	B-19

3.4	<i>Justierung mit Reagenz</i>	B-25
3.4.1	Dichtebestimmung Reagenzien	B-25
3.4.2	Eichkurven	B-26
3.4.3	Gravimetrische Volumenkontrolle.....	B-29
3.5	<i>Befüllkontrolle</i>	B-30
3.6	<i>Initialvolumen</i>	B-31
3.7	<i>Zuordnung Reagenzien</i>	B-32
4	Photometer	B-33
4.1	<i>BVD Ag</i>	B-33
4.1.1	Prozedur	B-33
4.1.2	Plattenlayout	B-34
4.1.3	Transformation	B-34
4.1.4	Validierung.....	B-35
4.1.5	CutOFF	B-36
4.2	<i>IBRgB</i>	B-37
4.2.1	Prozedur	B-37
4.2.2	Plattenlayout	B-37
4.2.3	Transformation	B-38
4.2.4	Validierung.....	B-39
4.2.5	CutOFF	B-40
4.3	<i>IBRgE</i>	B-40
4.3.1	Procedure	B-40
4.3.2	Plattenlayout	B-41
4.3.3	Transformation	B-41
4.3.4	Validation.....	B-42
4.3.5	CutOFF	B-42
4.4	<i>Ergebnistabellen Kontrolle Plattenlayout</i>	B-43
4.4.1	BVD Ag	B-43
4.4.2	IBRgB	B-48
4.4.3	IBRgE	B-53
4.5	<i>Zuordnung Messprogramm – Test</i>	B-58
6	Testläufe	B-59
6.1	<i>Ergebnistabellen zu 2.4.1</i>	B-60
6.1.1	IBRgE.....	B-60
6.1.2	BVD Ag.....	B-62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbauschema Waschkopf.	5
Abbildung 2: Ventilstationen mit Kanälen zu den Waschcontainern.	6
Abbildung 3: Schema der Schlauchführung der Washer.	6
Abbildung 4: Aufbauschema Dispensierkamm.	12
Abbildung 5: Funktionsprinzip Dispenser.	12
Abbildung 6: Versuchsaufbau Silikonschlauchtest.	14
Abbildung 7: Abhängigkeit der zufälligen Messabweichung von der Verdünnung.	15
Abbildung 8: Zusammenhang zwischen Volumen und optischer Dichte der Farblösung.	16
Abbildung 9: Dispensierverhalten der Nadeln von Dispenser 1.	16
Abbildung 10: Dispensierverhalten der Nadeln von Dispenser 2.	17
Abbildung 11: Dispensierverhalten der Nadeln von Dispenser 3.	17
Abbildung 12: Zustand der Nadeln.	19
Abbildung 13: Horizontale Reproduzierbarkeit bei IBRgE.	31
Abbildung 14: vertikale Reproduzierbarkeit bei IBRgE.	31
Abbildung 15: Ergebnisse des Dispensertests.	35
Abbildung 16: Verschlusschrauben der Dispenser 3.	36
Abbildung 17: Reaktion der Verschlusschrauben von Dispenser 3 und Substrat.	37
Abbildung 18: Darstellung Verteilung von Fe ³⁺ -Ionen im Röhrensystem eines Kammes.	37
Abbildung 19: Schema indirekter ELISA.	A-1
Abbildung 20: Schema kompetitiver ELISA.	A-3
Abbildung 21: Funktionsschema Photometer.	A-5
Abbildung 22: Screenshot Edition BVD Ag.	B-1
Abbildung 23: Screenshot Edition IBRgB.	B-2
Abbildung 24: Screenshots Edition IBRgE.	B-3
Abbildung 25: Screenshot Waschprogramm BVD Ag von Washer 1 (Port: COM11).	B-5
Abbildung 26: Screenshot Waschprogramm BVD Ag von Washer 2 (Port: COM12).	B-6
Abbildung 27: Screenshot Waschprogramm BVD Ag von Washer 3 (Port: COM13).	B-6
Abbildung 28: Screenshot Waschprogramm IBRgB.	B-7
Abbildung 29: Screenshot Waschprogramm IBRgB von Washer 2.	B-8
Abbildung 30: Screenshot Waschprogramm IBRgB von Washer 3.	B-8
Abbildung 31: Screenshot Waschprogramm IBRgE von Washer 1.	B-9
Abbildung 32: Screenshot Waschprogramm IBRgE von Washer 2.	B-10
Abbildung 33: Screenshot Waschprogramm IBRgE von Washer 3.	B-10
Abbildung 34: Screenshot Rezept Befüllkontrolle.	B-13
Abbildung 35: Screenshot Waschprogramm Befüllkontrolle.	B-14
Abbildung 36: Screenshot Rezept Absaugkontrolle.	B-14
Abbildung 37: Screenshot Waschprogramm Absaugkontrolle.	B-15
Abbildung 38: Screenshot Waschprogramm Sleep.	B-16
Abbildung 39: Screenshot Steuerungsfenster Ultraschallbad.	B-16
Abbildung 40: Screenshot Waschprogramm Reinigung, 1. Teil.	B-16
Abbildung 41: Screenshot Waschprogramm P_Day_Rinse.	B-17
Abbildung 42: Eichkurve Reagenzien, D1, K1.	B-26
Abbildung 43: Eichkurve Reagenzien, D1, K2.	B-26
Abbildung 44: Eichkurve Reagenzien, D1, K3.	B-26
Abbildung 45: Eichkurve Reagenzien, D2, K1.	B-27
Abbildung 46: Eichkurve Reagenzien, D2, K2.	B-27
Abbildung 47: Eichkurve Reagenzien, D2, K3.	B-27
Abbildung 48: Eichkurve Reagenzien, D3, K1.	B-28
Abbildung 49: Eichkurve Reagenzien, D3, K2.	B-28
Abbildung 50: Eichkurve Reagenzien, D3, K3.	B-28
Abbildung 51: Screenshot Rezept QC_Dispenser_1.	B-30
Abbildung 52: Screenshot der Messprozedur für BVD Ag.	B-33
Abbildung 53: Plattenlayout für BVD Ag.	B-34
Abbildung 54: Berechnung des korrigierten OD – Wertes für BVD Ag.	B-34
Abbildung 55: Berechnung des S-N – Wertes für BVD Ag.	B-35

Abbildung 56: Festlegung der ersten Validierungsbedingung für BVD Ag.	B-35
Abbildung 57: Festlegung der zweiten Validierungsbedingung für BVD Ag.	B-36
Abbildung 58: Festlegung des Grenzwertes zwischen positivem und negativem Probenergebnis für BVD Ag.	B-36
Abbildung 59: Screenshot der Messprozedur für IBRgB.	B-37
Abbildung 60: Plattenlayout für IBRgB.	B-37
Abbildung 61: Berechnung des korrigierten OD – Wertes für IBRgB.....	B-38
Abbildung 62: Berechnung der prozentualen Blockierung durch die Probe für IBRgB.....	B-38
Abbildung 63: Festlegung der ersten Validierungsbedingungen für IBRgB.	B-39
Abbildung 64: Festlegung der zweiten Validierungsbedingungen für IBRgB.....	B-39
Abbildung 65: Festlegung der Grenzwerte zwischen negativem, fraglichem und positivem Ergebnis der Probe für IBRgB.	B-40
Abbildung 66: Screenshot der Messprozedur für IBRgE.....	B-40
Abbildung 67: Plattenlayout für IBRgE.....	B-41
Abbildung 68: Berechnung des P/N – Wertes der Proben für IBRgE.....	B-41
Abbildung 69: Festlegung der Validierungsbedingungen für IBRgE.	B-42
Abbildung 70: Festlegung der Grenzwerte zwischen negativem, fraglichem und positivem Ergebnis der Probe für IBRgE.	B-42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnistabelle Funktionalität der Rezepte QC_Disp und QC_Asp.....	9
Tabelle 2: Übersicht der Einstellungen der Dispensierkämme.....	19
Tabelle 3: Ergebnistabelle Volumenkontrolle Dispenser.	20
Tabelle 4: Fehlergrenzen nach ISO 8655 für Einzeldispensionen.	20
Tabelle 5: Diskussion der Volumenkontrolle.	21
Tabelle 6: Gesamtergebnistabelle Dispenser.	24
Tabelle 7: Validierungs- und Berechnungsgrundlagen.....	26
Tabelle 8: Geforderte Einstellungen für die photometrische Messung der Assays.....	27
Tabelle 9: Übersicht der Ergebnisse der Validierung des Photometers.	29
Tabelle 10: Diskussion Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE.	32
Tabelle 11: Ergebnistabelle der Kontrollen für den Testlauf BVD Ag.	32
Tabelle 12: Ergebnistabelle Überprüfung Washer.	33
Tabelle 13: Mittelwerte und zufällige Messabweichung aus Überprüfung der Washer.	34
Tabelle 14: Versuchsschema Überprüfung Dispenser.....	34
Tabelle 15: Übersicht Reinigungsmaßnahmen.....	36
Tabelle 16: Messdaten der Prüfung der Analysenwaage.	A-6
Tabelle 17: Übersichtstabelle Dichte der Reagenzien.....	A-7
Tabelle 18: Diskussion der Dichtebestimmung.	A-7
Tabelle 19: Messergebnisse der 1:1000 verdünnten Farbstofflösung.....	A-8
Tabelle 20: Ergebnistabelle Zuordnung Waschlösung Assay BVD Ag.....	B-4
Tabelle 21: Ergebnistabelle Zuordnung Waschlösung Assay IBRgB.	B-4
Tabelle 22: Ergebnistabelle Zuordnung Waschlösung IBRgE.....	B-4
Tabelle 23: Ergebnistabelle Zuordnung Waschlösung Multi Assay Testlauf.	B-5
Tabelle 24: Ergebnistabelle Überprüfung Anzahl Waschzyklen BVD Ag.	B-7
Tabelle 25: Ergebnistabelle Überprüfung Anzahl Waschzyklen IBRgB.	B-9
Tabelle 26: Ergebnistabelle Überprüfung Anzahl Waschzyklen IBRgE.	B-11
Tabelle 27: Ergebnistabelle Überprüfung Anzahl Waschzyklen im Multi Assay Test.	B-11
Tabelle 28: Übersichtstabelle Einstellungen der Waschprogramme.....	B-12
Tabelle 29: Ergebnistabelle Wascherfolg.	B-13
Tabelle 30: Ergebnisübersicht der Validierung der Washer.	B-15
Tabelle 31: Überschussberechnung Reagenzien.	B-18
Tabelle 32: Ergebnisse Silikonschlauchtest.	B-18
Tabelle 33: Messwerte der Verdünnungen der Farblösung.	B-19
Tabelle 34: Einstellungen der Dispenser nach Kalibrierung auf 100µl mit a.dem durch Fa. Peters. ..	B-19
Tabelle 35: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 1, Kamm 1.....	B-19
Tabelle 36: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der einzelnen Nadeln von D1, K1.....	B-20
Tabelle 37: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D1, K1.	B-20
Tabelle 38: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 1, Kamm 2.....	B-20
Tabelle 39: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D1, K2.	B-20
Tabelle 40: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D1, K2.	B-20
Tabelle 41: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 1, Kamm 3.....	B-21
Tabelle 42: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D1, K3.	B-21
Tabelle 43: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D1, K3.	B-21
Tabelle 44: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 2, Kamm 1.....	B-21
Tabelle 45: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D2, K1.	B-22
Tabelle 46: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D2, K1.	B-22
Tabelle 47: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 2, Kamm 2.....	B-22
Tabelle 48: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D2, K2.	B-22
Tabelle 49: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D2, K2.	B-22
Tabelle 50: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 2, Kamm 3.....	B-23
Tabelle 51: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D2, K3.	B-23
Tabelle 52: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D2, K3.	B-23
Tabelle 53: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 3, Kamm 1.....	B-23
Tabelle 54: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D3, K1.	B-24
Tabelle 55: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D3, K1.	B-24

Tabelle 56: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 3, Kamm 2.....	B-24
Tabelle 57: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D3, K2.	B-24
Tabelle 58: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D3, K2.	B-24
Tabelle 59: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 3, Kamm 3.	B-25
Tabelle 60: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D3, K3.	B-25
Tabelle 61: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D3, K3.	B-25
Tabelle 62: Messwerte der Dichtebestimmung der Reagenzien.	B-25
Tabelle 63: Wertetabelle der Eichkurven für Dispenser 1.	B-26
Tabelle 64: Wertetabelle der Eichkurven für Dispenser 2.	B-27
Tabelle 65: Wertetabellen der Eichkurven für Dispenser 3.	B-28
Tabelle 66: Übersicht der Einstellungen der Dispensierkämme.	B-29
Tabelle 67: Übersicht der Einstellungen der Dispensierkämme.	B-29
Tabelle 68: Ergebnistabelle Volumenkontrolle.	B-29
Tabelle 69: Ergebnistabelle Dispensionskontrolle Dispenser.	B-30
Tabelle 70: Ergebnistabelle Zeitintervall Initialvolumen.	B-31
Tabelle 71: Ergebnistabelle Volumen Initialvolumen.	B-31
Tabelle 72: Reagenzkontrolle Assay BVD Ag.	B-32
Tabelle 73: Reagenzkontrolle Assay IBRgB.	B-32
Tabelle 74: Reagenzkontrolle Assay IBRgE.	B-32
Tabelle 75: Reagenzkontrolle gemischte Assays.	B-33
Tabelle 76: Ergebnisse der Validierungsberechnungen für BVD Ag bei Messung mit Tecan Sunrise Photometer.	B-43
Tabelle 77: Überprüfung der Validierungsberechnung für BVD Ag.	B-43
Tabelle 78: Überprüfung der S-N – Werte und der Befundungsergebnisse für BVD Ag.	B-43
Tabelle 79: Vergleich der Ergebnisse für BVD Ag der Photometer Gen5 und Tecan Sunrise.	B-46
Tabelle 80: Ergebnisse der Validierungsberechnungen für IBRgB mit Tecan Sunrise Photometer. ...	B-48
Tabelle 81: Überprüfung der Validierungsberechnung für IBRgB.	B-48
Tabelle 82: Überprüfung der prozentualen Hemmwerte und der Befundungsergebnisse für IBRgB.	B-49
Tabelle 83: Vergleich der Ergebnisse der Photometer Gen5 und Tecan Sunrise für IBRgB.	B-51
Tabelle 84: Ergebnisse der Validierungsberechnungen IBRgE mit Tecan Sunrise Photometer.	B-53
Tabelle 85: Überprüfung der Validierungsberechnung von Gen5 für IBRgE.	B-53
Tabelle 86: Überprüfung der P/N – Werte und der Befundungsergebnisse für IBRgE.	B-54
Tabelle 87: Vergleich der Ergebnisse der Photometer Gen5 und Tecan Sunrise für IBRgE.	B-56
Tabelle 88: Ergebnistabelle Zuordnung Messprogramm.	B-58
Tabelle 89: Ansatzschema horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit.	B-59
Tabelle 90: Ansatzschema Verteilung über mehrere Testplatten.	B-59
Tabelle 91: Ergebnistabelle horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit IBRgE.	B-60
Tabelle 92: Diskussion horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit IS 1 : 40.	B-60
Tabelle 93: Diskussion horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit negativ Pool.	B-60
Tabelle 94: Diskussion horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit positiv Pool.	B-61
Tabelle 95: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142756.	B-61
Tabelle 96: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142757.	B-61
Tabelle 97: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142758.	B-61
Tabelle 98: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142759.	B-62
Tabelle 99: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142760, manuelle Abarbeitung.	B-62
Tabelle 100: Testläufe BVD Ag.	B-62
Tabelle 101: Daten Washerprüfung.	B-64
Tabelle 102: Messwerte MTP 2.	B-66

Abkürzungsverzeichnis

A	Oberfläche
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
A _q	Querschnittsfläche
BK	Bindungskapazität
CV	Coefficient of Variation
D	Durchmesser
DIN	Deutsches Institut für Normen
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
e _s	systematische Messabweichung
F	Kraft
gE	Glykoprotein E
gB	Glykoprotein B
IS	Interner Standard
LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
LHC	Liquid Handling Control
m	Masse
MTP	Mikrotiterplatte
n	Anzahl der Messungen
OD	Optische Dichte
p	Druck
q _v	Volumenstrom
QM	Qualitätsmanagement
QMH	Qualitätsmanagement-Handbuch
QMS	Qualitätsmanagement-System
r	Radius
s	zufällige Messabweichung
SOP	Standard Operating Procedure
t	Zeit
TMB	Tetramethylbenzidine
V	Volumen
V _s	Prüfvolumen
w	Strömungsgeschwindigkeit
π	Kreiszahl
ρ	Dichte

1 Einleitung

1.1 Betrieb¹

Das Veterinärinstitut Oldenburg (VI OL) ist seit dem 01.07.2001 Teil des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (**LAVES**). Seine Aufgaben umfassen neben dem Tier- und Verbraucherschutz schwerpunktmäßig ebenfalls die Diagnostik und Bekämpfung von Tierseuchen und anderen Tierkrankheiten. Dies wird hauptsächlich von den Fachbereichen 21 – 25 der Abteilung 2 vorgenommen, darunter die Serologie (Fachbereich 24), in der die Bachelorarbeit durchgeführt worden ist. Dort werden v.a. **Serum**- und **Plasmaproben** von Rindern auf diverse virale und bakterielle Antikörper (**AK**) und Antigene (**AG**) anzeigepflichtiger Tierseuchen untersucht.

Das LAVES umfasst die bis 2001 staatlichen Untersuchungsämter für Veterinärdiagnostik, Lebensmittel und Bedarfsgegenstände als Institute. Ziel dieser Zusammenfassung ist die frühzeitige Erkennung und Bekämpfung von Gesundheitsrisiken. Die Umsetzung erfolgt durch ständige Kontrollen und wird durch ein Qualitätsmanagementsystem nach DIN EN ISO/IEC 17025 reglementiert. Zu diesem Zweck ist jedes einzelne der Institute akkreditiert und zertifiziert:

Die Veterinärinstitute Oldenburg und Hannover, die Lebensmittelinstitute Oldenburg und Braunschweig, das Institut für Fische und Fischereierzeugnisse Cuxhaven, das Institut für Bedarfsgegenstände Lüneburg, das Futtermittelinstitut Stade und das Institut für Bienenkunde Celle.

1.2 DIN EN ISO/IEC 17025 und QM

Die ISO Norm 17025 bereitgestellt durch das Deutsche Institut für Normung (DIN) ist eine anerkannte europäische Norm. Sie beschreibt die Anforderungen an das Qualitätsmanagementsystem (QMS) und wird im Qualitätsmanagement (QM) des VI OL mit dem Qualitätsmanagementhandbuch (QMH) umgesetzt. Das QM dient der Sicherstellung der Vertrauenswürdigkeit und Zuverlässigkeit der Untersuchungsergebnisse² und ist Voraussetzung „für die Anerkennung von Untersuchungsergebnissen durch die Behörden anderer Länder, die Industrie sowie anderer Laboratorien“³.

¹ Vgl. Schrandt: www.laves.niedersachsen.de, 2011

² Vgl. Thalmann: „Qualitätsmanagementhandbuch des Veterinärinstitutes Oldenburg“, Teil 2/1, S. 1

³ Ebd.

1.3 Fragestellung

In der täglichen Laborroutine soll die von der Firma PETERS Technologie entwickelte und konstruierte **ELISA**-Roboteranlage die Abarbeitung der **Assays** „HerdCheck BVDV Ag/Serum Plus“, „HerdCheck IBRgB“ und „HerdCheck Anti-IBRgE Antibody Test“⁴ der Firma IDEXX GmbH eigenständig korrekt durchführen. In der ELISA-Roboteranlage sind neben den von der Firma PETERS Technologie konstruierten Eingangsmo-
dul und Ausgangslift, Hotel und Dispenser (3x) auch Geräte Dritter enthalten:

- 3x Elx405 Mikroplatten-**Washer** der Firma BioTek®
- PowerWave 340 Mikroplatten-**Spektralphotometer** der Firma BioTek®
- Industrieroboter der Fa. DENSO WAVE INCORPORATED
- Je 1x **Inkubator** STX 110 IC und STX 110 HC der Firma LiCONiC Instruments

Ziel dieser Bachelorarbeit ist die Bestätigung, dass die ELISA-Roboteranlage die in der Leistungsbeschreibung des Gerätes und der Präambel der Ausschreibung des VI OL geforderten Parameter erfüllt. Das bedeutet, dass die Anlage bei voller Auslastung unterschiedliche Assays korrekt bearbeitet und dabei sowohl die Vorgaben des Herstellers als auch die des Qualitätsmanagements und der DIN EN ISO/IEC 17025 einhält.

1.3.1 Test - Beschreibung⁵

Die Bovine Virus Diarrhoe (BVD) wird durch das gleich benannte Virus aus dem Genus der Pestiviren verursacht. Zu den Symptomen zählen starker Durchfall, Fieber und abnehmende Milchleistung. Eine Infektion des Fötus kann zu Abort, Totgeburt oder der Geburt von Virus-Dauerausscheidern führen. Letztere erkranken häufig an der **letalen** Mucosal Disease, die sich durch Schäden und Geschwüre an den Schleimhäuten des Verdauungstraktes kennzeichnet. Im Allgemeinen bedeutet dies hohe wirtschaftliche Verluste für die Halter.⁶

Die Infektiöse Bovine Rhinotracheitis (**IBR**) bezeichnet die respiratorische Erkrankungsform einer Infektion mit dem Bovinen Herpesvirus Typ 1. Die Infektion der Atemwege kann in Einzelfällen zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen, es kann zum Rückgang der Milch- und Mastleistung, Sekundärinfektionen sowie Fruchtbarkeitsstörungen und Tod kommen.⁷ Dieses Virus weist u.a. sowohl die Glykoproteine E (gE) und B (gB) auf. Bei den Assays IBRgB und IBRgE werden jeweils die entspre-

⁴ Im folgenden werden die Assays verkürzt benannt: BVD Ag, IBRgB, IBRgE

⁵ Vgl. IDEXX LABORATORIES: Gebrauchsinformation der einzelnen Assays, 2010

⁶ Vgl. Mayr et. al: „Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre“, 1993, S. 361 f.

⁷ Ebd., S. 261

chend gegen diese Proteine des BHV-1 Virus des Rindes gerichteten Antikörper spezifisch nachgewiesen. Die Assays dienen zur Unterscheidung von geimpften und natürlich infizierten Tieren: In den Impfstoffen liegt das für den Impfschutz unwesentliche Virusglykoprotein gE nicht vor. Somit werden gegen dieses Protein auch keine Antikörper gebildet. Daher reagiert das Serum eines geimpften aber nicht-infizierten Tieres im Assay IBRgB positiv und im Assay IBRgE negativ.

- BVD Ag⁸ : Bei diesem Assay wird das Antigen der Bovinen Virus Diarrhoe (**BVDV**) in Serum-, Plasma-, Vollblut- und Ohrstanzproben in einem direkten ELISA nachgewiesen.
- IBRgB⁶ : Nachweis von gegen das Glykoprotein gB des Bovinen Herpes-Virus I (**BHV-1**) gerichtete spezifische Antikörper in Serum- und Plasmaproben in einem kompetitiven ELISA .
- IBRgE⁶ : Nachweis von gegen das Glykoprotein gE des BHV-1 Virus gerichtete spezifische Antikörper in Serum- und Plasmaproben in einem kompetitiven ELISA.

1.3.2 Validierungsparameter

Die **Prüfung** der ELISA-Roboteranlage erfolgt über die Auswertung der jeweiligen **Log-Files** und weiterer Funktionalitäten. Zudem wird die Fehlererkennung und -meldung geprüft. Desweiteren werden die Einzelkomponenten wie folgt **validiert**:

- Dispenser :
- Justierung und Kalibrierung der Dispensierkämme
 - Überprüfung der korrekten Zuordnung der unterschiedlichen Reagenzien
- Waschgeräte :
- Kontrolle der Verwendung der korrekten Waschlösungen
 - Überprüfung des Befüll- und Absaugvorgangs
- Photometer :
- Überprüfung des **Plattenlayouts**
 - Überprüfung der Zuordnung der Messprogramme zu den Assays
 - Vergleich der Messung mit einem anderen validierten Photometer
 - Kontrolle der Validierungsgrundlagen

⁸ Für detailliertere Testprinzipien vgl. Anhang A, S. A-1 ff.

- Kontrolle der **Befundung**
- Kontrolle der Datenübertragung

Zuletzt werden Vergleichsansätze durchgeführt. Hierbei werden dieselben Proben zeitgleich sowohl „von Hand“ als auch mit der ELISA-Roboteranlage bearbeitet.

1.3.3 Funktionsweise ELISA – Roboteranlage

Die Fa. PETERS Technologie stellt neben den technischen Geräten auch die Software *A.WARE lab automation control* (im Folgenden A.WARE genannt) ebenso wie das zum Betrieb notwendige Computerprogramm (nachfolgend: Rezept) *Preparation_05* zur Abarbeitung der **Mikrotiterplatten** (MTP) bereit. Alle Einzelkomponenten der ELISA – Roboteranlage (inklusive Washer und Spektralphotometer der Fa. BioTek®) sind in A.WARE als Klienten definiert und steuerbar. Die Assays werden mit sämtlichen Parametern wie Inkubationszeit, Waschlösung und Reagenz vom Administrator editiert. Auch der zu verwendende Kanal für Waschlösung und Reagenz je Assay wird hier definiert⁹.

Alle MTP erhalten einen individuellen Barcode. Dieser enthält Informationen über die Art des Assays und die Position der einzelnen Proben und Kontrollen. Die Assays sind über die ersten beiden Ziffern der Barcodes definiert:

BVD Ag	:	70
IBRgB	:	12
IBRgE	:	14

Die MTP werden über das Eingangsmodul in die Anlage eingebracht. Der Roboterarm befördert diese zunächst zur Barcode -Lese-Position. Hier wird der Barcode der MTP eingescannt und die MTP den jeweiligen Bearbeitungsschritten des entsprechenden Assays zugeordnet: Dauer der einzelnen Inkubationen, Kanal der zu verwendenden Waschlösung und Reagenzien, entsprechendes Messprotokoll des Photometers. Die Abarbeitung der MTP gliedert sich in folgende Schritte: erste Inkubation, erstes Waschen, **Konjugatzugabe**, zweite Inkubation, zweites Waschen, **Substratzugabe**, dritte Inkubation, Zugabe **Stopplösung**, photometrische Messung, Ausschleusen der MTP über Ausgangslift.

⁹ Vgl. dazu Anhang B, Abbildung 22 - Abbildung 24, Anhang S. B-1 - B-3

2 Methoden

2.1 Washer

Die MTP werden in den Washern der Fa. BioTek[®] zwischen den einzelnen Inkubationen von ungebundenem Material gereinigt. Dabei ist ein sauberes Waschergebnis die Grundlage für ein valides ELISA – Ergebnis. Die Verwendung der richtigen Waschlösung ist von immenser Bedeutung: Die Verwendung einer falschen Waschlösung führt unter Umständen zur unvollständigen Entfernung des ungebundenen Materials, so dass falsch positive/negative Ergebnisse erzielt werden könnten. Die korrekte Waschlösung im Zusammenspiel mit der Anzahl der Waschzyklen garantiert eine vollständige Entfernung des ungebundenen Materials.¹⁰ Aus diesem Grund müssen die Nadeln auch stets gängig sein, damit ein korrektes Dispensieren und Aspirieren gewährleistet ist. Daher ist ein Konzept zur Reinigung und täglichen Funktionskontrolle unabdingbar.

2.1.1 Funktionsprinzip

Die Waschlösung wird mittels einer Kolbenpumpe in einen 96 – Kanal Waschcomb gepumpt und über die einzelnen Dispensierdüsen in die MTP abgegeben. Mittels einer Vakuumpumpe werden Flüssigkeiten und Waschlösungen über die Aspirationsdüsen entfernt.

Eine vollständige Aspiration der gesamten Flüssigkeit wird durch das kreuzweise Absaugen sichergestellt. Hierbei wird die Aspirationsdüse zunächst in der Mitte der **Kavität** positioniert. In einem zweiten Absaugschritt findet eine Positionierung am Rand der Kavität statt.¹¹

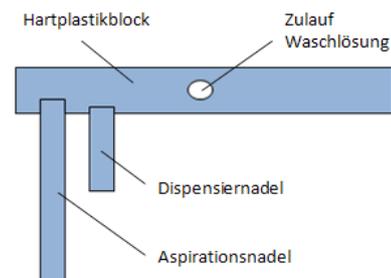


Abbildung 1: Aufbauschema Waschkopf.
Dargestellt sind jeweils eine von 96 Dispensier- und Aspirationsdüsen. Der Hartplastikblock ist von innen hohl, sodass die Waschlösung zu den einzelnen Düsen geleitet werden kann.

2.1.2 Zuordnung der Waschlösungen

Jeder Washer soll in der Lage sein, jeden Assay zu bearbeiten. Hierzu verfügt jedes Gerät über 4 Kanäle, die über eine Ventilstation an die entsprechenden Waschlösungen angeschlossen sind:

¹⁰ Vgl. IDEXX GmbH: „ELISA Technisches Handbuch“, 2011, S. 16

¹¹ Vgl. BioTek[®] Instruments, Inc.: „ELx405™ Bedienungshandbuch“, 2008, S. 1-13

- Kanal 1 : IBRgE
- Kanal 2 : BVD Ag
- Kanal 3 : IBRgB

Ein vierter Kanal dient der Reinigung der Geräte und ist speziell für einen Anschluss an ein Reinigungsdetergenz bzw. an **a.dem** vorgesehen. Auf die Bedeutung der Reinigung wird unter 2.1.3 näher eingegangen.

Die Gesamtzahl von 12 Kanälen macht eine eindeutige Beschriftung und anschließende Kontrolle der verwendeten Waschlösung zwingend notwendig, wie Abbildung 2 und Abbildung 3 verdeutlichen:

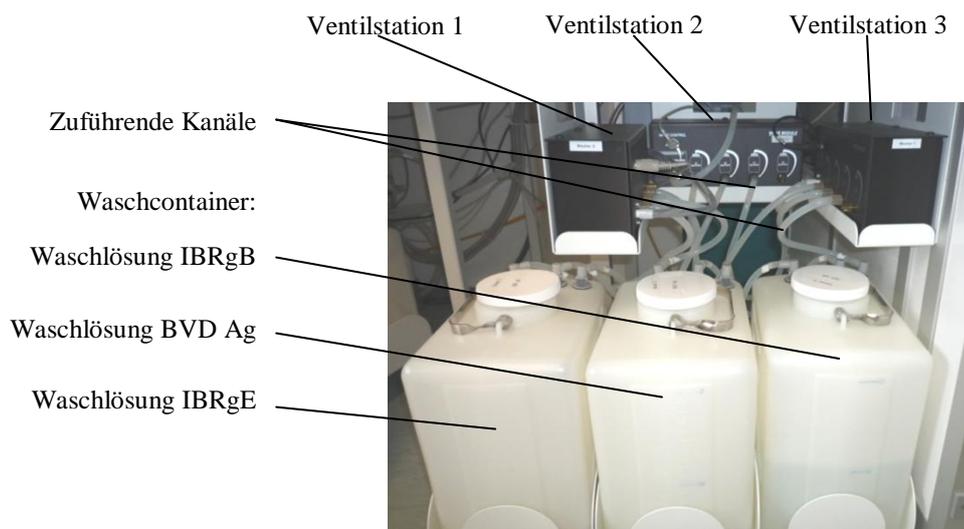


Abbildung 2: Ventilstationen mit Kanälen zu den Waschcontainern.

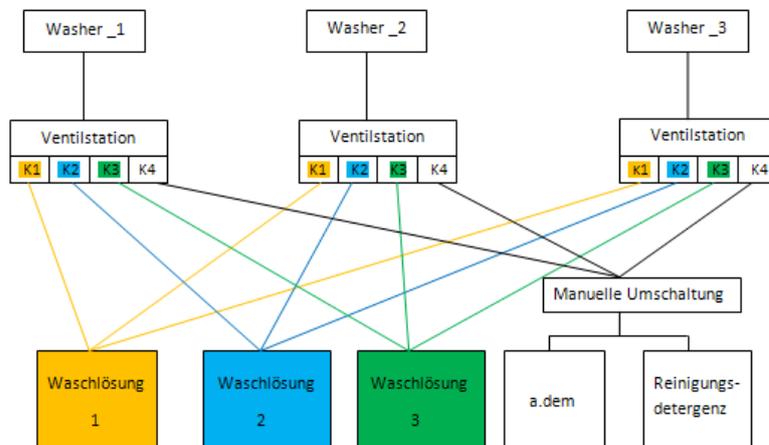


Abbildung 3: Schema der Schlauchführung der Washer.
Jeder Washer ist mit je einem Kanal an allen Waschlösungen angeschlossen.

Durchführung:

Statt der Waschcontainer werden zur Überprüfung der verwendeten Kanäle 5L Erlenmeyerkolben (Kolben) verwendet. Alle Kanäle eines Assays werden in einem Kolben platziert. Dies bedeutet, dass jeweils der Kanal 1 von Washer 1, Washer 2 und Washer 3 zusammengeführt werden. Der Flüssigkeitsstand wird am Kolben markiert. Im Versuch wird statt der Waschlösung a.dem verwendet. Dies ist vertretbar, da das Waschergebnis an diesem Punkt nicht von Bedeutung ist. Es werden MTP ohne Probenmaterial zum Austesten verwendet.

Zunächst werden die Assays einzeln (single) getestet. Hierfür wird nur der jeweils zu verwendende Kolben mit a.dem gefüllt. Es werden MTP mit dem entsprechenden Barcode in die ELISA-Roboteranlage eingeschleust, so dass die originalen Assay-Editionen gestartet werden. Die Inkubationszeiten werden zur erleichterten Durchführung auf eine Minute reduziert. Im Klient „Roboter“ wird beobachtet, welche MTP transportiert wird und der jeweilige Washer notiert. Das Ergebnis ist in Ordnung, wenn sich der Flüssigkeitspegel im Kolben während des Waschens entsprechend senkt. Im Anschluss werden die Assays parallel (multi) getestet. Hierfür werden entsprechend 3 Kolben mit a.dem gefüllt und der Flüssigkeitsstand markiert. Die weitere Vorgehensweise ist analog zum Single Assay Test.

Ergebnis:

Es wurde sowohl im Single Assay als auch im Multi Assay Test jeweils die korrekte Waschlösung verwendet¹².

2.1.3 Überprüfung der Waschprogramme

Die Waschprogramme werden in der von der Fa. BioTek[®] bereitgestellten Liquid Handling Control (LHC) Software manuell editiert. Hier werden die Anzahl der Waschzyklen und das Volumen je Waschzyklus festgelegt. Ferner werden neben der Höhe auch die horizontale Position der Nadeln und die Geschwindigkeit bei Aspiration und Dispension festgelegt. Im Weiteren wird der zu verwendende Kanal bestimmt¹³.

Die Angaben der Gebrauchsanweisungen der einzelnen Assays der Fa. IDEXX bezüglich Waschlösung, Anzahl der Waschzyklen und der Volumina je Waschzyklus sind unbedingt einzuhalten. Werden nicht genügend Waschzyklen durchgeführt, kommt es zu einer starken Hintergrundfärbung bei der Messung der Platte. Zu einer unzureichen-

¹² Vgl. Ergebnistabellen Single Assay Test Anhang B, Tabelle 20 -Tabelle 22, S. B-4, Ergebnistabellen Multi Assay Test Anhang B, Tabelle 23, S. B-5

¹³ Anmerkung: In der LHC sind die Kanäle alphabetisch sortiert. A.WARE wandelt diese Sortierung in eine numerische um (z.B. Valve A = Kanal 1)

den Farbentwicklung kommt es bei zu vielen Waschzyklen.¹⁴ Gefordert sind für jeden Assay 5 Waschzyklen mit einem Volumen von je 300µl¹⁵. Auch die horizontale und vertikale Position der Nadeln hat Auswirkungen auf das ELISA-Ergebnis: Sind die Nadeln zu niedrig (vertikale Position) kann es zu einer Beschädigung der MTP-Beschichtung kommen, so dass gebundenes Material eventuell von der MTP gewaschen wird. Ist die vertikale Position zu hoch eingestellt, werden die Kavitäten evtl. nicht vollständig abgesaugt. Dies ist aber zwingend notwendig, da Reste von Waschlösung oder Reagenz die nachfolgenden Reaktionen und somit das Endergebnis beeinflussen können.¹⁶ Eine zentrierte horizontale Position garantiert ein gleichmäßiges Entfernen der Waschlösung aus der kreisrunden Kavität. Diese wird durch eine zweite Position am Rand der Kavität ergänzt. Im Weiteren muss ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Waschzyklen und vor dem Einbringen der Reagenzien vermieden werden.¹⁷

2.1.3.1 Anzahl Waschzyklen

Durchführung:

Eine Überprüfung der Einstellungen in den Waschprogrammen findet über die Kontrolle der Screenshots statt¹⁸. Anschließend wird die Zahl der Waschzyklen visuell kontrolliert. Zunächst werden die Assays im Single Testlauf getestet. Dazu werden MTP mit den entsprechenden Barcodes eingeschleust (Prinzip vgl. 2.1.2). Bei den einzelnen Waschsritten wird die Anzahl der Waschzyklen visuell beobachtet und notiert. Danach erfolgt ein Multi Assay Testlauf. Hierbei werden MTP mit den Barcodes aller Assays wie unter 2.1.2 gestartet.

Ergebnis:

Sowohl bei den Single als auch den Multi Assay Testläufen wurde jeweils die korrekte Anzahl Waschzyklen durchgeführt¹⁹.

¹⁴ Vgl. IDEXX GmbH: „ELISA Technisches Handbuch“, 2011, S. 19 - 20

¹⁵ Vgl. IDEXX LABORATORIES: Gebrauchsinformation der jeweiligen Assays, 2010

¹⁶ Vgl. IDEXX GmbH: „ELISA Technisches Handbuch“, 2011, S. 16

¹⁷ Ebd. + vgl. dazu Anhang B, Tabelle 28, S. B-12 und Tabelle 29, S. B-13

¹⁸ Vgl. Anhang B, Abbildung 25 - Abbildung 33, S. B-5 - B-10

¹⁹ Vgl. Anhang B, Tabelle 24 - Tabelle 27, S. B-7 - B-11

2.1.3.2 Befüll- und Absaugkontrolle

Mit dieser Methode soll eine tägliche Funktionsüberprüfung/Qualifikationsprüfung gemäß QMH, Teil 3, SOP 06-9²⁰ durchgeführt werden. Hierbei werden die Dispensions- und Aspirationsnadeln auf evtl. Verunreinigungen visuelle Kontrolle getestet. Um dies zu ermöglichen werden laborinterne Rezepte²¹ erstellt, bei denen die MTP zu den einzelnen Washern gebracht und anschließend zum Ausgangslift gebracht werden:

- a) Befüllen der Kavitäten mit Waschlösung²²: Es werden über das Waschprogramm QC_Disp die Kavitäten vollständig mit Waschlösung befüllt.
- b) Absaugen der Waschlösung²³: Über das Waschprogramm QC_Asp findet ein kreuzweises Absaugen der Kavitäten statt.

Durchführung:

In das Eingangsmodul wird zur Befüllkontrolle eine leere MTP gegeben und das jeweilige QC_Disp-Rezept gestartet. Anschließend findet eine visuelle Kontrolle der Flüssigkeitsstände statt. Bei QC_Asp wird eine befüllte MTP in das Eingangsmodul gegeben und das entsprechende Rezept gestartet. Im Anschluss wird die abgesaugte MTP auf saugfähigen Tüchern ausgeklopft und diese auf Flüssigkeitsrückstände geprüft.

Ergebnis:

Beide Rezepte wurden stets korrekt ausgeführt. Zudem waren die MTP immer korrekt befüllt bzw. es befanden sich keine Flüssigkeitsrückstände auf den Tüchern.

Tabelle 1: Ergebnistabelle Funktionalität der Rezepte QC_Disp und QC_Asp.

Die Rezepte werden bei allen drei Washern auch in der Wiederholung korrekt ausgeführt. Disp. = Dispension, Asp. = Aspiration.

	Disp.	Asp.		Disp.	Asp.		Disp.	Asp.
Washer 1			Washer 2			Washer 3		
1	OK	OK	1	OK	OK	1	OK	OK
2	OK	OK	2	OK	OK	2	OK	OK
3	OK	OK	3	OK	OK	3	OK	OK
4	OK	OK	4	OK	OK	4	OK	OK
5	OK	OK	5	OK	OK	5	OK	OK
6	OK	OK	6	OK	OK	6	OK	OK
7	OK	OK	7	OK	OK	7	OK	OK
8	OK	OK	8	OK	OK	8	OK	OK
9	OK	OK	9	OK	OK	9	OK	OK
10	OK	OK	10	OK	OK	10	OK	OK

²⁰ Thalmann: „Qualitätsmanagementhandbuch des Veterinärinstitutes Oldenburg“, 2009, Teil 3, SOP 06-9, S. 9

²¹ Ähnlich dem Rezept Preparation_05, s. S. 4

²² Vgl. hierzu Anhang B, Abbildung 34 und Abbildung 35, S. B-13 f.

²³ Vgl. hierzu Anhang B, Abbildung 36 und Abbildung 37, S. B-14 f.

2.1.4 Reinigung und Wartung

Auf Grund der salzhaltigen Waschlösungen²⁴ kann es zu einem Verkrusten der Dispositions- und Aspirationsnadeln an der Luft kommen. Durch die verhinderte Aufnahme/Abgabe der Waschlösung wird zum einen ungebundenes Material nicht aus der Kavität entfernt und zum anderen kann es zu einem Übertreten der Waschlösung in andere Kavitäten kommen. Ebenso können Proteinreste aus dem Probenmaterial in den Nadeln verbleiben. Beides führt zu falschen Testergebnissen.²⁵

Es werden verschiedene vorbeugende Maßnahmen ergriffen:

2.1.4.1 Soak Prozedur nach definierter Standzeit

Nach 45min²⁶ des Nicht-Gebrauchs des Washers wird automatisch der Waschkopf mit 40ml der aktuellen Waschlösung gefüllt und das Reservoir mit 93ml gefüllt. In dieses tauchen die Nadeln ein. So verharrt der Waschkopf bis zum nächsten Gebrauch. Dies soll ein Verkrusten der Nadeln verhindern (vgl. Abbildung 38, S. B-16).

2.1.4.2 Tägliche Reinigung

Die Washer besitzen eine integrierte Ultraschallbadfunktion. Zunächst werden dafür die Nadeln mit insgesamt 200ml der aktuellen Waschlösung gespült und anschließend das Reservoir mit 93ml gefüllt. Die Nadeln tauchen in das Reservoir ein und das Ultraschallbad wird für 10min gestartet (vgl. Abbildung 39, S. B-16).²⁷

2.1.4.3 Wöchentliche Reinigung

Für hartnäckige Proteinreste und zur Vermeidung von Ablagerungen wird eine wöchentliche Reinigung mit einem speziellen Reinigungsdetergenz durchgeführt. Nach Empfehlung des Herstellers ist diese im monatlichen Rhythmus durchzuführen.²⁸ Aus Gründen der möglichen Komplikationen bei einer starken Verunreinigung wird zunächst ein wöchentlicher Rhythmus gewählt. Zur Wahl des Reinigungsdetergenzes wird auf die Erfahrung des Fachbereichs 25 des VI Oldenburg mit automatisierten Systemen zurückgegriffen. Dort wird seit einiger Zeit mit dem Reinigungsmittel Decon[®] 90 in 3% Konzentration bei einer 2stündigen Einwirkzeit erfolgreich gearbeitet²⁹. Dies wird für die Washer der ELISA-Roboteranlage übernommen. Der Anschluss des Reinigungsde-

²⁴ Vgl. IDEXX Laboratories, PAS Technical Service: „IDEXX Common Kit Components“, 2010, S. 10

²⁵ Vgl. IDEXX GmbH: „ELISA Technisches Handbuch“, 2011, S. 16-17

²⁶ Vgl. BioTek[®] Instruments, Inc.: „ELx405™ Operators Manual“, 2008, S. 104 – 112

²⁷ Ders., S. 130 f.

²⁸ Ders., S. 111

²⁹ Vgl. : Decon Laboratories Unlimited, Angaben zum Produkt

tergenzes erfolgt an Kanal 4. Nach der Einwirkzeit wird das Reinigungsdetergenz durch Spülen mit 5x400ml a.dem aus dem System entfernt (vgl. auch Abbildung 40 - Abbildung 41, S. B-16 f.).

2.1.5 Gesamtergebnis Washer

Alle erforderlichen Parameter funktionieren bei allen Washern einwandfrei: Es wird jeweils die richtige Waschlösung für alle Assays verwendet. Die Waschprogramme sind korrekt editiert und die Anzahl der Waschzyklen wird auch eingehalten. Die Höhen und Geschwindigkeiten beim Befüllen/Absaugen der Nadeln sind optimal eingestellt und die Maschinenpflege ist geklärt.

2.2 Dispenser

Die Dispenser geben die einzelnen Reagenzien in die Kavitäten. Sie müssen eine korrekte Volumenabgabe ebenso garantieren wie die Verwendung des richtigen Reagenzes. Nur dadurch können vertrauenswürdige und somit valide ELISA - Ergebnisse erzielt werden.³⁰ Daher ist eine Justierung und Kalibrierung gemäß DIN EN ISO 8655³¹ unabdingbar. Ebenfalls müssen die Nadeln stets gängig sein, damit das richtige Volumen dispensiert werden kann. Daher sind Konzepte zur Reinigung und täglichen Kontrolle notwendig.

2.2.1 Funktionsweise

Jeder Dispenser besteht aus drei Dispensierkämmen (= Kämme) mit jeweils 8 Nadeln. Jeder Kamm ist durch Silikonschläuche (=Kanäle) über eine Ventilstation mit einer Reagenzflasche verbunden. Auf diese Weise kann ein Dispenser bis zu drei verschiedene Reagenzien dispensieren. Dabei ist jedem Dispenser eine Sorte Reagenz zugeordnet, die einzelnen Kämme sind den jeweiligen Assays zugeordnet:

- | | | |
|-------------|---|-------------|
| Dispenser 1 | : | Konjugat |
| Dispenser 2 | : | Substrat |
| Dispenser 3 | : | Stopplösung |
| Kanal 1 | : | IBRgE |
| Kanal 2 | : | BVD Ag |
| Kanal 3 | : | IBRgB |

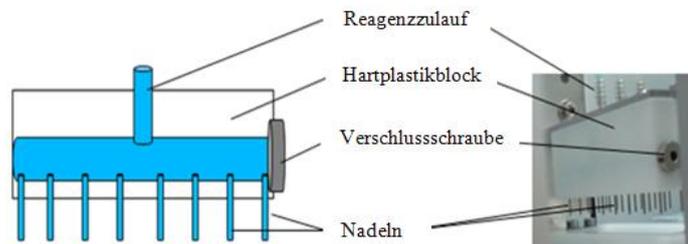


Abbildung 4: Aufbauschema Dispensierkamm.
Im rechten Abbildungsteil ist eine Einheit bestehend aus drei Kämmen gezeigt. Hierbei hat jeder Kamm einen separaten Reagenzzulauf.

In der Ausgangsposition stehen alle drei Kämmen über einer Abfallwanne, in der überschüssiges Reagenz, Reinigungsdetergenz und andere Flüssigabfälle abgegeben werden können. Ein **MTP-Carrier** positioniert die Kavitäten der MTP bei jedem Dispensier-

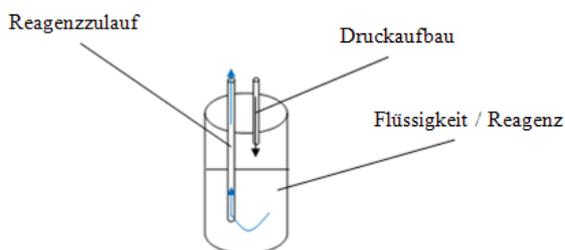


Abbildung 5: Funktionsprinzip Dispenser.
Über einen Kompressor wird Druck auf die Flüssigkeit ausgeübt. Diese wird dadurch in den Zulaufschlauch gepresst.

vorgang unterhalb der entsprechenden Nadeln (Steuerung durch A.WARE). Durch dieses System wird zeitgleich sowohl ein Vermischen der Reagenzien untereinander als auch eine Kontamination der Nadeln mit Probenmaterial ausgeschlossen. Die Dispenser arbeiten nach dem Prinzip der positiven Druckentspan-

³⁰ Vgl. IDEXX LABORATORIES: Gebrauchsinformation der einzelnen Assays, 2010

³¹ Deutsches Institut für Normung e.V., Normenausschuss FNL a und NaMed, 2002

nung.³² Dies bedeutet, dass über einen Kompressor im Reagenzgefäß ein eingestellter Druck aufgebaut wird, welcher auf die Flüssigkeit wirkt. Durch den Druck wird die Flüssigkeit in den ersten Teil des Zulaufschlauches gepumpt. Bei geöffnetem Ventil kann die Flüssigkeit über den zweiten Teil des Zulaufschlauches aus den Nadeln strömen. Hierbei wird das Volumen über die Öffnungsdauer der Ventile gesteuert.

Der auf die Flüssigkeit wirkende Druck p definiert sich über die ausgeübte Kraft F und die Größe der Oberfläche A :

$$p = \frac{F}{A} \quad (1)$$

Die Oberfläche A berechnet sich über den Radius r und der Kreiszahl π :

$$A = r^2 \cdot \pi \quad (2)$$

Somit steht der aufgebaute Druck im Zusammenhang mit dem Durchmesser D der Reagenzflaschen:

$$D = 2 \cdot r \quad (3)$$

Über einen Sensor wird der Druck in den Schott-Flaschen konstant gehalten. Somit variiert die auf die Flüssigkeit ausgeübte Kraft F . Nach Umstellen von (1) ergibt sich für die Kraft F :

$$F = p \cdot A \quad (4)$$

Das Produkt aus Strömungsgeschwindigkeit w und der Querschnittsfläche A_q ergibt den Volumenstrom q_v :

$$q_v = w \cdot A_q \quad (5)$$

Wobei der Volumenstrom q_v über den Quotienten des Volumens V und der Zeit t definiert wird:

$$q_v = \frac{V}{t} \quad (6)$$

Mit Umstellen von (6) nach V und dem Einsetzen von (5) wird die Abhängigkeit des Volumens von der Ventilöffnungszeit deutlich:

$$V = q_v \cdot t = w \cdot A_q \cdot t \quad (7)$$

Durch Ersetzen von A_q durch $\frac{F}{p}$ (vgl. (4)) wird auch die Abhängigkeit des Volumens von Kraft und Druck gezeigt:

$$V = w \cdot \frac{F}{p} \cdot t \quad (8)$$

Dies bedeutet, dass bei einer kleineren Oberfläche A die ausgeübte Kraft F auf die Flüssigkeit abnimmt. Der Radius des Zulaufschlauches ändert sich dabei nicht. Folglich wird bei gleichbleibender Öffnungszeit ein geringeres Volumen in den Zulaufschlauch

³² Angabe der Fa. PETERS Technologie

und somit durch die Nadeln gedrückt. Aus diesem Grund muss bei Schott-Flaschen mit unterschiedlichen Radien für jeden Radius eine gesonderte Justierung und Kalibrierung erfolgen. Zur Erstvalidierung der ELISA-Roboteranlage werden Reagenzflaschen mit einem Fassungsvermögen von 500ml und einem Durchmesser von 86mm verwendet.

2.2.2 Funktionstauglichkeitsprüfung der Nadeln

Es muss sichergestellt werden, dass alle Nadeln der Dispenser stets das gleiche Volumen abgeben.³³ Infolge der Bauweise der Dispensierkämme (vgl. Abbildung 4) besteht die Gefahr, dass die äußeren Nadeln auf Grund der Flüssigkeitsverteilung innerhalb eines Kammes ein zu geringes Volumen abgeben. In einer Vorabprüfung soll das abgegebene Volumen über eine photometrische Messung bestimmt werden.

Für die Vorabprüfung wurde das Produkt „Tinte 4001/Türkis“ der Firma Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG in Verdünnung als Farbstofflösung verwendet. Ein klarer Vorteil in diesem Produkt besteht – im Gegensatz zu den Reagenzien – in den geringen Materialkosten und der guten Verfügbarkeit. Zudem enthält die Farbstofflösung keine toxischen, oxidativen oder sonstigen für das System schädigende Eigenschaften³⁴, die andere Chemikalien mit sich bringen könnten.

2.2.2.1 Reaktion der Reagenzien und Farblösung mit Silikonschläuchen

Zunächst wurde der Einfluss der Reagenzien und Farbstofflösung auf die bei der ELISA-Roboteranlage verwendeten Silikonschläuche überprüft.

Durchführung:

Ein Stück Schlauch wird in einem Becherglas gebogen und mit dem entsprechenden Reagenz bzw. der Farbstofflösung befüllt. Das Becherglas wird für die Dauer des jeweiligen Versuches mit Alufolie abgedeckt. Die Reaktionen werden sieben Tage beobachtet. Aus Kostengründen werden Reagenzien verwendet, deren Ablaufdatum bereits überschritten ist³⁵.

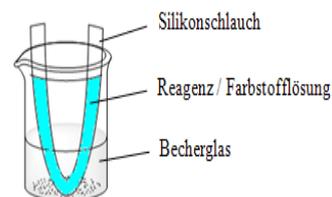


Abbildung 6: Versuchsaufbau Silikonschlauchtest.

³³ Vgl. Thalmann: „Qualitätsmanagementhandbuch des Veterinärinstituts Oldenburg“, 2009, Teil 3, SOP 06-9, S. 2

³⁴ Vgl. Sicherheitsdatenblatt Nr. 13003, Ausgabe 4, Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG

³⁵ Anmerkung: In den Assays ist stets ein leichter Überschuss an Reagenzien im Verhältnis zu den MTP enthalten (s. Tabelle 31, Anhang B, S. B-18), welcher für andere Zwecke wie z.B. den o.g. verwendet werden kann.

Ergebnis³⁶:

Innerhalb von 7 Tagen weist das Konjugat aller drei Assays leichte Ausflockungen auf. Nach der Aussage der Fa. IDEXX³⁷ handelt es sich hierbei um Proteinfällungen, die auf das Alter der Reagenzien zurückzuführen sind. Die Substrate aller drei Assays verursachen ein leichtes Vergilben der Schläuche. Diese Reaktion ist irreversibel. Es zeigten sich keine Folgen für das Material der Schläuche oder die Ergebnisse der Proben. Sowohl bei den verschiedenen Stopplösungen als auch bei der Farbstofflösung wurden innerhalb von 7 Tagen keinerlei Reaktionen beobachtet. Die Flüssigkeiten blieben klar, die Schläuche behielten ihre ursprüngliche Farbe und Beschaffenheit. Eine Verwendung des Produkts „Tinte 4001/Türkis“ kann daher bedenkenlos erfolgen.

2.2.2.2 Verdünnung der Farbstofflösung

Die Farbstofflösung soll in einer Konzentration verwendet werden, bei der eine geeignete **optische Dichte** (OD) erreicht wird. Ziel der Verdünnung ist eine möglichst geringe zufällige Messabweichung (= hohe Präzision) innerhalb der OD-Werte. Ebenso soll die Verdünnung in geeigneten Stufen erreichbar sein.

Ergebnis³⁸:

Die höchste Präzision wird bei der Verdünnungsstufe 1:1000 erreicht. Ein besseres Ergebnis wäre durch eine höhere Verdünnung nicht zu erreichen³⁹.

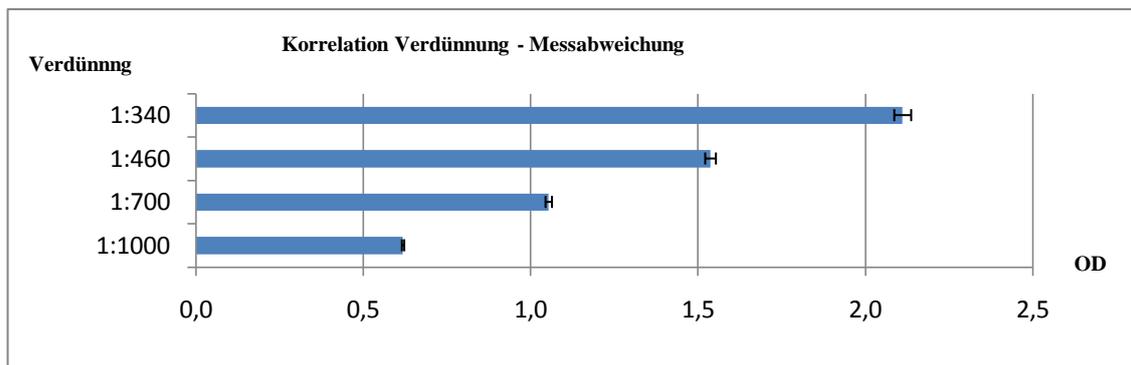


Abbildung 7: Abhängigkeit der zufälligen Messabweichung von der Verdünnung. Mit steigender Verdünnungsstufe nimmt die Präzision zu.

³⁶ Vgl. dazu auch Anhang B, Tabelle 32, S. B-18

³⁷ Telefonat mit Kundenservice vom 27.05.2011

³⁸ Versuchsdurchführung s. Anhang A, S. A-6

³⁹ Vgl. dazu Anhang B, Tabelle 33, S. B-19

2.2.2.3 Funktionstauglichkeitsprüfung

Die Dispenserkämme wurden mit einer garantierten maximalen **zufälligen** Messabweichung von $\pm 2\%$ a.dem von Fa. PETERS Technologie inklusive Kalibrierung bei 21°C mit a.dem geliefert. Die Einstellungen wurden zur Funktionstauglichkeitsprüfung übernommen (vgl. dazu Tabelle 34, Anhang B, S. B-19). Zwischen OD und dispensiertem Volumen besteht ein linearer Zusammenhang⁴⁰:

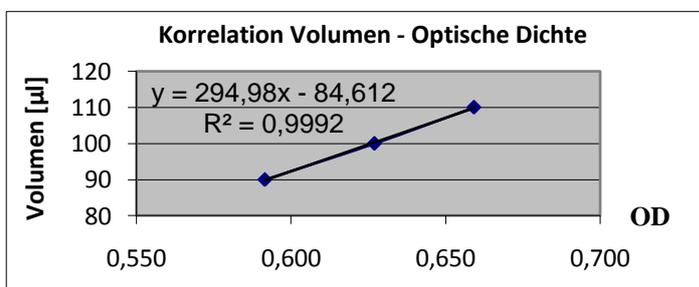


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen Volumen und optischer Dichte der Farblösung.

Die Regressionsgerade von 0,999 zeigt, dass mit dem Volumen der Wert der optischen Dichte linear zunimmt.

Durchführung:

Die Reagenzflaschen werden mit jeweils 400ml Farbstofflösung der Verdünnung 1:1000 befüllt und an den entsprechenden Zulaufschläuchen angeschlossen. Diese werden mit 1ml der Farbstofflösung gespült. Anschließend wird eine unbeschichtete MTP im MTP-Carrier des entsprechenden Dispensers positioniert. Über die Steuerungssoftware A.WARE werden mit dem zu testenden Kamm in jede Kavität der MTP 100µl der Farbstofflösung abgegeben. Anschließend erfolgt die Messung bei 620nm mit dem Tecan Sunrise Photometer.

Ergebnisse:⁴¹

Alle Nadeln der 9 Käme geben mit einer Präzision von max. $\pm 2\%$ stets das gleiche Volumen ab:

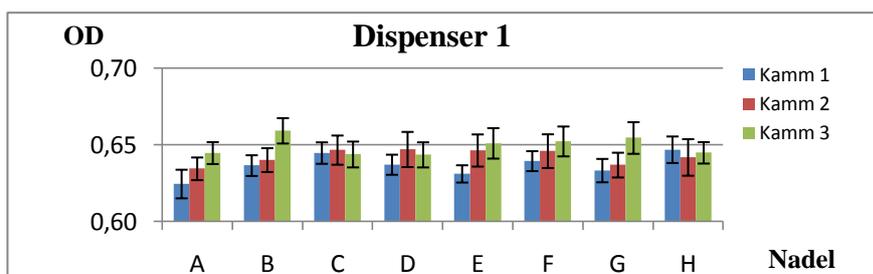


Abbildung 9: Dispensierverhalten der Nadeln von Dispenser 1.

Die Abweichungen der optischen Dichte von 1 – 2% (vgl. Anhang B: Tabelle 36, Tabelle 39, Tabelle 42, S. B-20 ff.) liegen im geforderten Rahmen.

⁴⁰ Versuchsdurchführung s. Anhang A, S. A-8

⁴¹ Messergebnisse und Auswertungstabellen s. Anhang B, Tabelle 35 - Tabelle 61, S. B-19 - B-25

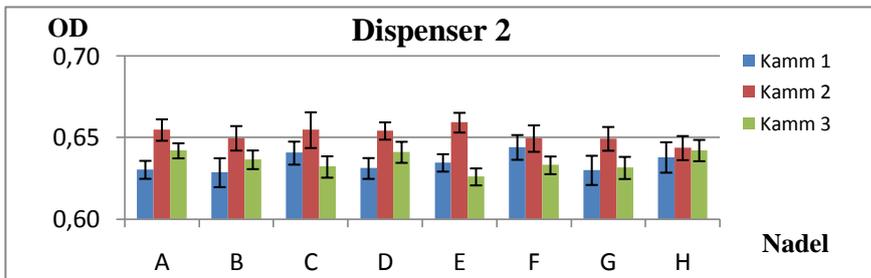


Abbildung 10: Dispensierverhalten der Nadeln von Dispenser 2.
Die Abweichungen der optischen Dichte von 1 – 2% (vgl. Anhang B, Tabelle 45, Tabelle 48, Tabelle 51, S. B-22 ff.) liegen im geforderten Rahmen.

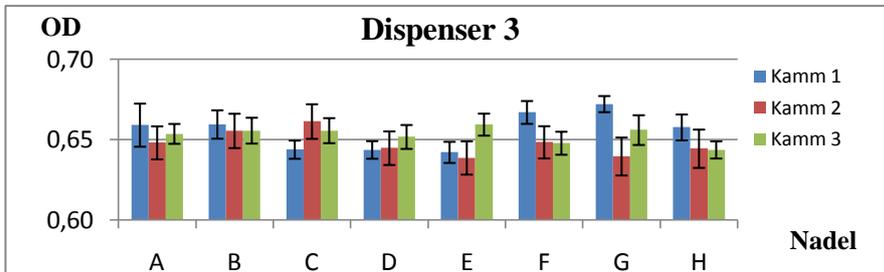


Abbildung 11: Dispensierverhalten der Nadeln von Dispenser 3.
Die Abweichungen der optischen Dichte von 1 – 2% (vgl. Anhang B, Tabelle 54, Tabelle 57, Tabelle 60, S. B-24 f.) liegen im geforderten Rahmen.

Innerhalb eines Kammes sind minimale Unterschiede ebenso wie zwischen den Kämmen vorhanden. Diese Differenzen bewegen sich aber innerhalb der angegebenen Grenzen und können daher als nicht-signifikant betrachtet werden. Auch die äußeren Nadeln bewegen sich innerhalb dieser Grenzen und geben stets das korrekte Volumen ab.

2.2.3 Justierung und Kalibrierung

Grundsätzlich müssen „[e]rgebnisrelevante Geräte [...] zuverlässig richtige Ergebnisse mit der erforderlichen Empfindlichkeit liefern.“⁴² Dies bedeutet, dass die Dispenser das geforderte Volumen (**Nennvolumen**) bei Einhaltung festgelegter Fehlergrenzen abgeben müssen. Durch die **Anwenderjustierung** erfolgt die Einstellung des Nennvolumens. Nach DIN EN ISO 8655, Teil 1, S. 10 ist eine Qualifikationsprüfung in Form einer **Kalibrierung** nach Justierung und im Weiteren jährlich erforderlich. Die in den Assays enthaltenen Reagenzien haben eine andere Zusammensetzung⁴³ und somit andere Fließeigenschaften als a.dem beim Pipettieren / Dispensieren. Beim manuellen Pipettieren werden diese Faktoren durch ein Anpassen der Abgabegeschwindigkeit und der **Ablauf-** und **Wartezeiten** ausgeglichen. Beim Dispenser müssen diese Faktoren bereits beim Justieren mit berücksichtigt werden. Dazu werden diejenigen Reagenzien verwen-

⁴² Vgl. Thalmann: „Qualitätsmanagementhandbuch des Veterinärinstitutes Oldenburg“, 2009, Teil 3, SOP 06-9, S. 2

⁴³ Vgl. IDEXX Laboratories, PAS Technical Service: „IDEXX Common Kit Components“, 2010

det, die der jeweilige Kamm dispensieren soll. Entsprechend muss auch die Kalibrierung unter Verwendung des entsprechenden Reagenzes stattfinden.

2.2.3.1 Justierung

Jeder Kamm wird separat anhand von Eichkurven justiert. Die Eichkurven liefern die Grundlage für die Justierung und Kalibrierung der Nadeln. Die Geradengleichungen der Regressionsgeraden liefern die Werte für die individuelle Einstellung jedes Dispensierkammes:

$$y = m \cdot x + n \quad (9)$$

Im Klient Dispenser können für jeden Kamm jeweils die Werte für m und n eingetragen werden. Von der Steuerungssoftware AWARE werden daraus die Ventilöffnungszeiten berechnet.

Durchführung:

Im Klient des jeweiligen Dispensers werden der auf die Flüssigkeit wirkende Druck und die Ventilöffnungszeiten eingestellt. Für die Dispenser 1 und 2 wird ein Druck von 0,5 bar eingestellt (Empfehlung der Fa. PETERS Technologie) und die Ventilöffnungszeiten 100ms, 225ms und 350ms jeweils dreimal getestet. Etwa in der Mitte dieses Messbereiches wird das Volumen von 100 μ l erwartet. Die Werte für Dispenser 3 sind abweichend. Der Druck wird auf 0,1bar eingestellt und Ventilöffnungszeiten von 250ms, 350ms und 450ms getestet. Grund für diese Entscheidung liegt im Funktionsprinzip der Assays: Dispenser 3 gibt die Stopplösung auf das bereits in den Kavitäten befindliche Substrat. Um eine Schaumbildung⁴⁴ durch Zugabe der Stopplösung zu vermeiden, muss diese möglichst langsam in die Kavitäten abgegeben werden.

Für jeden Kamm werden drei MTP befüllt. Deren Gewicht wird auf einer **Analysenwaage** bestimmt. Im Diagramm werden die Mittelwerte der Masse gegen die jeweiligen Ventilöffnungszeiten aufgetragen (s. dazu Eichkurven in Anhang B, Abbildung 42 - Abbildung 50, S. B-26 ff.) und die Regressionsgeraden bestimmt⁴⁵.

⁴⁴ Schaum in den Kavitäten führt zu ungenauen photometrischen Ergebnissen durch unberechenbare Brechungen des Lichts.

⁴⁵ Ergebnis der Einstellungen vgl. Anhang B, Tabelle 66, S. B-29

Ergebnis:

Aus den Regressionsgeraden ergeben sich für jeden Kamm individuelle Werte und Ventilöffnungszeiten für m und n für ein Volumen von 100µl.

Tabelle 2: Übersicht der Einstellungen der Dispensierkämme.

Die Einstellungen beziehen sich auf die Beladung mit Reagenz. Der angegebene Druck ist der in den Schottflaschen erzeugte Luftdruck, der auf die Reagenzien ausgeübt wird.

Dispenser 1	Druck [bar]	100µl		
		m	n	t [ms]
Kamm 1	0,5	0,7542	-3,7871	138
Kamm 2		0,7568	-6,5715	141
Kamm 3		0,7655	-6,8765	140
Dispenser 2	0,5			
Kamm 1		0,7108	-7,9342	152
Kamm 2		0,7904	-6,0658	134
Kamm 3		0,7479	-6,7448	143
Dispenser 3	0,1			
Kamm 1		0,2870	-5,2654	367
Kamm 2		0,2784	-9,1910	392
Kamm 3		0,2667	-8,2004	406

2.2.3.2 Kalibrierung

Durchführung:

Es können nur die Kämme individuell eingestellt werden, die Nadeln nicht. Die Kalibrierung erfolgt daher durch die Ermittlung des Gesamtvolumens einer vollständig dispensierten MTP. Wie bei 2.2.3.1 werden die entsprechenden Reagenzien an die jeweiligen Kämme angeschlossen und die Zulaufschläuche befüllt. Nach Einstellung der in

der Justierung ermittelten Werte für m und n werden in jede Kavität 100µl dispensiert. Vor jedem Dispensieren einer MTP wird ein Volumen von 1ml als Ausstoßvolumen⁴⁶ in der Abfallwanne abgegeben. Dies stellt ein vollständiges Befüllen der Nadeln mit Flüssigkeit trotz

der Verdunstungsprozesse sicher. Für jedes Reagenz werden jeweils 10 MTP mit dem jeweiligen Kamm dispensiert und das Gewicht mittels Analysenwaage bestimmt.

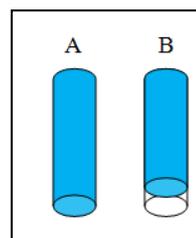


Abbildung 12: Zustand der Nadeln.
A Die Nadel ist vollständig mit Flüssigkeit gefüllt. B Nach einiger Zeit ohne Abgabe von Flüssigkeit finden an der Spitze der Nadel Verdunstungsprozesse statt. Dadurch verringert sich das abgegebene Volumen bei gleicher Ventilöffnungszeit.

⁴⁶ Vgl. Deutsches Institut für Normung e.V.: „DIN EN ISO 8655-6“, 2002, S. 12

Ergebnis:

Das dispensierte Volumen berechnet sich aus der Dichte des eingesetzten Reagenzes und der Einwaage (vgl. Formel (13)). Da pro Kavität 100µl dispensiert werden, ergibt sich ein erwartetes Gesamtvolumen bei einer Testplatte mit 96 Kavitäten von 0,1ml*96 = 9,6ml.

Tabelle 3: Ergebnistabelle Volumenkontrolle Dispenser.

Kamm	Dispenser 1			Dispenser 2			Dispenser 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Mittelwert [g]	9,736	9,794	9,741	9,998	9,777	9,748	9,724	9,749	9,832
Volumen [ml]	9,573	9,640	9,625	9,614	9,595	9,613	9,621	9,586	9,565
Volumen pro Kavität [µL]	100	100	100	100	100	100	100	100	100

2.2.3.3 Diskussion

In Teil 5 der „DIN EN ISO 8655“⁴⁷ sind die Fehlergrenzen der **zufälligen** und **systematischen Messabweichung** festgelegt:

Tabelle 4: Fehlergrenzen nach ISO 8655 für Einzeldispensationen.

zufällige Messabweichung (+/-)[µl]	1,5
Variationskoeffizient (+/-)	0,3%
systematische Messabweichung (+/-)[µl]	0,3
systematische Messabweichung (+/-)	1,5%

Die zufällige Messabweichung s und der Variationskoeffizient CV werden nach den Formeln 14 und 15 im Anhang A, S. A-7 berechnet. Die systematische Messabweichung e_s berechnet sich aus der Differenz zwischen dem Mittelwert der Einzelmessungen \bar{V} und dem Prüfvolumen V_s :

$$e_s = \bar{V} - V_s \quad (10)$$

Die Angabe in Prozent erfolgt nach:

$$e_s = 100 \cdot \frac{(\bar{V} - V_s)}{V_s} \quad (11)$$

⁴⁷ Deutsches Institut für Normung e.V., 2002

Tabelle 5: Diskussion der Volumenkontrolle.
 Die Werte liegen für jeden Kamm innerhalb der geforderten Grenzen.

	zufällige Mess- abweichung [µl] (+/-) s	Variations- koeffizient CV	systematische Messabweichung [µl] (+/-)	systematische Mess- abweichung
Dispenser 1				
Kamm 1	0,02	0,2%	-0,027	-0,3%
Kamm 2	0,03	0,3%	0,04	0,4%
Kamm 3	0,02	0,2%	0,025	0,3%
Dispenser 2				
Kamm 1	0,03	0,3%	0,014	0,1%
Kamm 2	0,02	0,2%	-0,005	-0,1%
Kamm 3	0,01	0,1%	0,013	0,1%
Dispenser 3				
Kamm 1	0,03	0,3%	0,018	0,2%
Kamm 2	0,03	0,3%	-0,014	-0,1%
Kamm 3	0,03	0,3%	-0,035	-0,4%

Das gravimetrische Prüfverfahren verursacht einige Umstände (Beschaffung Analysenwaage aus anderem Fachbereich, Kalibrierung dieser nach Aufstellen mit Messnormalen). Daher bleibt zu prüfen, ob eine Vereinfachung der Qualifikationsprüfung durch ein alternatives Prüfverfahren realisierbar ist. In DIN EN ISO 8655, Teil 5, S. 4⁴⁸ wird auf eine photometrische Prüfung in Teil 7 derselben Norm hingewiesen. Dieser Teil der Norm wäre noch zu erwerben.

2.2.4 Kontrolle der Dispension

Auf Grund der häufigen Nutzung und der starken Ergebnisrelevanz der Dispenser empfiehlt sich analog zu den Washern eine tägliche Kontrolle der Funktionstauglichkeit der Nadeln durchzuführen.⁴⁹

Um dies zu ermöglichen werden laborinterne Rezepte erstellt. Diese beinhalten den Transport zum jeweiligen Dispenser, die Abgabe von 100µl durch Kamm 1 in die Reihen 1 – 4, Kamm 2 in die Reihen 4 – 8, Kamm 3 in die Reihen 9 – 12 sowie der abschließende Transport zum Ausgangslift⁵⁰. Die Kontrolle von jeweils vier Reihen je Kamm gewährleistet hinreichend die Beurteilung der Gleichmäßigkeit des Kammes. Ferner können dadurch etwaige Verunreinigungen erkannt und entsprechende Maßnahmen ergriffen werden (s. 2.2.7).

⁴⁸ Vgl. Deutsches Institut für Normung e.V., Normenausschuss FNLa und NaMed, 2002

⁴⁹ Vgl. Thalmann, „Qualitätsmanagementhandbuch des Veterinärinstitutes Oldenburg“, 2009, Teil 3, SOP 06-9, S. 3 + 9

⁵⁰ Vgl. Screenshot Rezept QC_Dispenser_1 im Anhang B, Abbildung 51, S. B-30

2.2.5 Initialvolumen

Wegen der Zusammensetzung der Reagenzien besteht die Gefahr einer Verkrustung der Nadeln. Dies kann wiederum in einer falschen Volumenverteilung resultieren. Zur Vermeidung sollen geringe Mengen Reagenz (Autodispensiervolumen) in einem definierten Zeitintervall in die Abfallwanne abgegeben werden. Desweiteren wurde die Bildung von Luftblasen in den zuführenden Schläuchen bei längerer Standzeit mit a.dem beobachtet. Dieses Problem soll ebenfalls behoben werden.

Durchführung:

Zur Bestimmung von Zeitintervall und Volumen wird ein Annäherungsverfahren verwendet:

A Zeitintervall

Zur Bestimmung des maximalen Zeitintervalls wird zunächst als Autodispensiervolumen die maximale Menge von 100µl veranschlagt. Es wird beobachtet, bei welchem Zeitintervall erste Dispensierungenauigkeiten entstehen. Dabei wird mit einem Zeitintervall von 5min begonnen, welches kontinuierlich in 5min – Schritten erhöht wird.

B Volumen

Bei dem optimalen Zeitintervall wird das Volumen herabgesetzt. Es wird bei 50µl begonnen. Das Intervall wird bis 20µl in 10µl-Schritten heruntersgesetzt, anschließend findet eine Reduzierung in 5µl Schritten statt.

Ergebnis⁵¹:

A Zeitintervall

Bis zu einem Zeitintervall von 10min entstehen bei allen Kämmen keine Dispensierungenauigkeiten. Erst ab einem Ausstoßintervall von 15min kommt es zu vereinzelt ungenauen Volumenabgaben, die in dem Verdunstungsprozess (vgl. 2.2.3.2) begründet liegen.

B Volumen

Das minimale Ausstoß-Volumen im optimalen Zeitintervall beträgt bei allen Kämmen 15µl.

⁵¹ Vgl. dazu auch Anhang B, Tabelle 70 und Tabelle 71, S. B-31

2.2.6 Zuordnung der Reagenzien

Wie in 2.2.1 beschrieben, kann jeder Dispenser jeweils drei verschiedene Reagenzien dispensieren. Jeder Dispenser wird dabei einem Testschritt zugeordnet. Dispenser 1 dispensiert Konjugat, Dispenser 2 Substrat und Dispenser 3 Stopplösung. Jedes Reagenz wurde für jeden Assay spezifisch entwickelt, so dass kein Austausch der Reagenzien zwischen den Assays möglich ist. Daher ist es unerlässlich, dass jedem Assay die richtigen Reagenzien zugeordnet werden.⁵² Die Zuordnung der Reagenzien steht dabei in Abhängigkeit von der Führung der Zulaufschläuche und der Programmierung des Rezepts Preparation_05.

Durchführung:

Jedem Assay wird eine Farbstofflösung zugeordnet, zusätzlich werden die MTP mit einem wasserfesten Farbstrich an der Seite markiert:

BVD Ag	:	Tinte 4001/Türkis	schwarzer Farbstrich
IBRgB	:	a.dem	roter Farbstrich
IBRgE	:	Tinte 4001/grün ⁵³	grüner Farbstrich

Analog zu der Vorgehensweise zur Zuordnung der Waschlösungen unter 2.1.2 werden die Assays zunächst einzeln getestet. Hierbei werden ebenfalls die original Assay-Editionen mit reduzierten Inkubationszeiten verwendet. Je Assay werden 10 MTP getestet. Im Klient ‚Roboter‘ werden die MTP beobachtet, der Barcode, Dispenser und die Farbstofflösung notiert. Anschließend werden die Assays parallel mit jeweils 5 MTP getestet.

Ergebnis:

Es werden sowohl im Single Assay Testlauf stets die korrekten Reagenzien verwendet⁵⁴ als auch im Multi Assay Testlauf⁵⁵. Daher ergibt sich eine einwandfreie Programmierung und eine korrekte Schlauchführung.

⁵² Vgl. IDEXX LABORATORIES: Gebrauchsinformation der jeweiligen Assays, 2010

⁵³ Ebenso wie Tinte 4001/Türkis ein Produkt der Fa. Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG

⁵⁴ Vgl. Anhang B, Tabelle 72 – Tabelle 74, S. B-32

⁵⁵ Vgl. Anhang B, Tabelle 75, S. B-33

2.2.7 Reinigung

Innerhalb der Reagenzien eines Assays können chargenspezifische Unterschiede auftreten. Daher sollen stets nur die Reagenzien und Testplatten der gleichen Charge verwendet werden⁵⁶. Hierfür ist es nötig, dass das Schlauchsystem der Dispenser vollständig von den Reagenzien der vorherigen Charge gereinigt wird. Ebenfalls soll eine gründliche Reinigung des Schlauchsystems wenigstens wöchentlich erfolgen. Bei längeren Abständen des Gebrauchs soll in der täglichen Routine der betreffende Kanal mit a.dem gespült und das Reagenz bei 4°C⁵⁷ gelagert werden.

Vorgehensweise:

Zunächst werden die Schläuche mit 3x2ml⁵⁸ a.dem gespült. Im zweiten Schritt werden die Schläuche und Nadeln mit einer 2%igen Lösung von Decon[®]90 gefüllt (Einwirkzeit 2h). In einem abschließenden Schritt wird das Reinigungsdetergenz vollständig durch Spülen mit 10x2ml aus Schläuchen und Nadeln entfernt.

2.2.8 Gesamtergebnis Dispenser

Die Funktionstauglichkeit der Nadeln ist für jedes Reagens eines jeden Assays gegeben. Ebenso wurde die Justierung der Nadeln für jeden Assay erfolgreich durchgeführt und positiv durch Kalibrierung bestätigt. Es wurde ein geeignetes Initialvolumen ermittelt und die Reagenzien werden korrekt den einzelnen Assays und Testschritten zugeordnet.

Tabelle 6: Gesamtergebnistabelle Dispenser.

Alle Anforderungen der Validierung an die Dispenser wurden erfüllt.

	BVD Ag	IBRgB	IBRgE
Nadel - Funktionstauglichkeit	OK	OK	OK
Justierung Nadeln	OK	OK	OK
Kalibrierung Nadeln	OK	OK	OK
Initialvolumen	OK	OK	OK
Zuordnung Reagenzien			
solo	OK	OK	OK
mix	OK	OK	OK

⁵⁶ Vgl. IDEXX GmbH: „ELISA Technisches Handbuch“, 2011, S. 3

⁵⁷ Vgl. IDEXX LABORATORIES: Gebrauchsinformation der einzelnen Assays, 2010

⁵⁸ Das Spülvolumen von 2ml ist durch das Fassungsvermögen der Abfallwanne bedingt.

2.3 Photometer

Nach Abschluss der einzelnen **Inkubationszeiten** werden die Testplatten im Photometer „PowerWave 340 Mikroplatten-Spektralphotometer“ (nachfolgend: Photometer) der Firma BioTek[®] bei den Assay-entsprechenden Wellenlängen gemessen und somit das Ergebnis der jeweiligen MTP festgestellt. Ein einwandfreier Betrieb des Gerätes ist daher für vertrauensvolle Ergebnisse unabdingbar. Ebenso essentiell ist die korrekte Edition der einzelnen Messprogramme in der Software. Diese enthalten das Plattenlayout (Position von Kontrollen und Proben), die Validierungsbedingungen sowie die Formeln der Berechnung der Testergebnisse.

2.3.1 Kalibrierung

Das im System befindliche Photometer befindet sich zu Beginn der Validierung im Lieferzustand. Nach DIN EN ISO / IEC 17025 dürfen neue Geräte erst in Betrieb genommen werden, wenn sie erfolgreich geprüft worden sind⁵⁹. In SOP 06-9 (Standard Operation Procedure) des QMH des VI OL ist weiterhin geregelt, dass vor Inbetriebnahme neuer Geräte eine Kalibrierung durchzuführen ist.⁶⁰ Ebenfalls garantiert die regelmäßige Kalibrierung neben einem täglichen automatischen Systemtest⁶¹ den einwandfreien Betrieb des Gerätes.

Durchführung:

Die Kalibrierung wird mit einer Absorbance Test Plate (=Kalibriertestplatte) der Fa. BioTek[®] nach Gebrauchsanweisung durchgeführt. Die getesteten Wellenlängen richten sich nach den in Betrieb verwendeten Wellenlängen: 450nm und 650nm.

Ergebnis:

Die Kalibrierung wurde erfolgreich durchgeführt. Das Ergebnisprotokoll ist im VI Oldenburg in der Gerätedokumentationskarte des Photometers einzusehen.

⁵⁹ Vgl. DIN, NQSZ: „DIN EN ISO/IEC 17025“, Abschnitt 4.6.2, S. 22

⁶⁰ Vgl. Thalmann: „Qualitätsmanagementhandbuch des Veterinärinstitutes Oldenburg“, 2009, Teil 3, SOP 06-9, S. 2 f. + S. 11

⁶¹ Vgl. BioTek[®] Instruments, Inc.: „PowerWave[™] Microplate Spectrophotometer, Operator's Manual“, 2009, S. 41 und vgl. Thalmann: „Qualitätsmanagementhandbuch des Veterinärinstitutes Oldenburg“, 2009, Teil 3, SOP 06-9, S. 11

2.3.2 Kontrolle Plattenlayout

Es werden die Einstellungen für die jeweiligen Messprogramme der einzelnen Assays entsprechend der Gebrauchsanweisung der einzelnen Assays in der Software „Gen 5“ der Fa. BioTek® editiert. Das Plattenlayout spiegelt die Position der Kontrollen, internen Standards und Proben wider. Grundsätzlich werden die Positionen A1 und B1 mit negativen Kontrollen, C1 und D1 mit positiven Kontrollen belegt. Die restlichen **Kavitäten** werden für Proben und **interne Standards** verwendet. Diese Positionen können variabel sein.

Im Messbereich wird die Wellenlänge der Probenmessung des jeweiligen Assays festgelegt. In manchen Assays ist optional ein Referenzbereich auswählbar. Dieser entspricht einer Leerwertmessung. D.h. dass bei einer Wellenlänge außerhalb des regulären Ergebnisbereiches gemessen wird. Dadurch erhält man die optische Dichte der MTP ohne Probenmaterial. Dieses Ergebnis kann dann von dem Ergebnis der Probenmessung abgezogen werden. Die CutOFF-Werte legen die Werte fest, bei denen eine Probe als positiv, fraglich oder negativ gewertet wird. In den Berechnungsgrundlagen wird festgelegt, wie der Wert der optischen Dichte zu verrechnen ist. Auf das Ergebnis der Berechnung beziehen sich sowohl die Beurteilung der Proben (CutOFF) als auch die Validierung der MTP: Die Validierungsgrundlagen legen die Rahmenbedingungen für die Gültigkeit der Ergebnisse einer MTP fest. Nur die Ergebnisse einer gültigen MTP sind vertrauensvoll (d.h. korrekt) und können als Grundlage weiterer Entscheidungen bezüglich der Bewertung der Probe dienen.

Tabelle 7: Validierungs- und Berechnungsgrundlagen⁶²

Pos.=positiv; neg.=negativ; P=S= Probe, N=Mittelwert negativer Kontrollen, PCx=Mittelwert der positiven Kontrollen nach Abzug des Leerwerts (Ergebnis bei 650nm), NCx=Mittelwert der negativen Kontrollen nach Abzug des Leerwerts (Ergebnis bei 650nm) .

	Berechnungsgrundlagen	Validierungsgrundlagen
IBRgB	1. $P_{\text{Corr450}} = P_{450} - P_{650}$ 2. $\% \text{Hemmung} = \frac{NCx - P_{\text{Corr450}}}{NCx} \times 100$	1. $NCx \geq 0,5$ 2. Hemmung $PCx > 80\%$
IBRgE	$\frac{P}{N} = \frac{\text{Probe}}{\text{neg. Kontrolle}}$	$PCx - NCx \geq 0,3$
BVD Ag	1. $S_{\text{Corr450}} = S_{450} - S_{650}$ 2. $S - N = S_{\text{Corr450}} - NCx$	1. $PCx - NCx \geq 0,150$ 2. $NCx \leq 0,250$

⁶² Vgl. IDEXX LABORATORIES, Gebrauchsinformation der einzelnen Assays, 2010

Tabelle 8: Geforderte Einstellungen für die photometrische Messung der Assays⁶³

	Messbereich [nm]	Referenzbereich [nm]	CutOFF
IBRgB	450	650	1. Probe<45% = neg. 2. 45%<Probe<55% = fraglich 3. Probe>55% = pos.
IBRgE	650	-	1. P/N<0,6 = pos. 2. 0,6<P/N<0,7 = fraglich 3. P/N>0,7 = neg.
BVD Ag	450	650	1. S-N<0,3 = neg. 2. S-N>0,3 = pos.

Durchführung:

Die korrekte Edition der einzelnen Messprogramme wird zum einen über Screenshots (s. Anhang B, Abbildung 52 - Abbildung 70, S. B-33 ff.) überprüft. Zum anderen erfolgt eine weitere Kontrolle durch einen Vergleich der Ergebnisse einer manuellen Nachberechnung der Kavitäten mit den Ergebnissen des Photometers⁶⁴. Dabei findet sowohl die Kontrolle der Validierungsgrundlagen als auch der Befundung statt.

Ergebnis:

Die manuelle Nachberechnung liefert für alle Assays exakt die gleichen Ergebnisse wie die Berechnung durch die Software. Auch die Bewertung der Proben ist identisch.

2.3.3 Zuordnung Messprogramm - Test

Die Messprogramme werden in der Software „Gen5“ der Fa. BioTek® hinterlegt. Die Steuerungssoftware „A.WARE“ der Fa. PETERS Technologie ruft diese Programme auf und ordnet sie den einzelnen Assays über den Zahlencode des Barcodes zu.

Es muss sichergestellt werden, dass von der Steuerungssoftware die korrekten Messprogramme zu den jeweiligen Assays geladen werden.⁶⁵

Durchführung:

Es werden 5 MTP je Assay getestet und dabei das geladene Messprogramm über den erzeugten Ausdruck, die erstellte Messwertdatei als auch über die Log-Files kontrolliert. Ebenfalls wird die Konvertierung der Messwerte in eine .asc-Datei und deren Übertragung an das betriebseigene LIMS überprüft. Dazu werden die original Assay-Editionen mit reduzierten Inkubationszeiten verwendet.

⁶³ Vgl. IDEXX LABORATORIES, Gebrauchsinformation der einzelnen Assays, 2010

⁶⁴ Vgl. Anhang B, Tabelle 77, Tabelle 78, S. B-43 f.; Tabelle 81, Tabelle 82, S. B-48 f.; Tabelle 85, Tabelle 86, S. B-53f.

⁶⁵ Vgl. Thalmann, „Qualitätsmanagementhandbuch des Veterinärinstitutes Oldenburg“, Teil 3, SOP 11-7, S.2

Ergebnis:

Bei jedem getesteten Assay stimmen die o.g. Positionen mit denen im Assay überein⁶⁶.

2.3.4 Kontrolle der Messergebnisse

Um die Möglichkeit einer fehlerhaften photometrischen Messung auszuschließen, wird eine Vergleichsmessung mit dem bereits etablierten Tecan Sunrise Photometer durchgeführt und die Werte der optischen Dichten miteinander verglichen⁶⁷. Dabei erfolgt ebenfalls eine Kontrolle der Befundung.

Ergebnis:

Die Ergebnisse stimmen bei allen Assays mit minimalen Abweichungen bei den Werten der optischen Dichte überein. Die Befundungsergebnisse des PowerWave 340 Mikroplatten-Spektralphotometer decken sich ebenfalls mit denen des Tecan Sunrise Photometers.

Diskussion:

Für BVD Ag liegen die Werte für Corr450 bei der Messung mit dem Power Wave 340 im Mittel um $0,004 \pm 0,03$ höher als bei der Messung mit dem Tecan Sunrise.

Für IBRgB liegen die Werte Corr450 bei der Messung mit dem Power Wave 340 im Mittel um $0,009 \pm 0,01$ niedriger als bei der Messung mit dem Tecan Sunrise.

Bei IBRgE liegen die Werte bei der Messung mit dem Power Wave 340 im Mittel um $0,024 \pm 0,02$ niedriger als bei der Messung mit dem Tecan Sunrise.

Bei beiden Photometern ist die OD Genauigkeit mit $\pm 0,01$ OD und die OD Wiederholgenauigkeit mit $\pm 0,005$ OD angegeben.⁶⁸ Dies bedeutet, dass die Differenz der Messwerte einer Probe bis zu $(0,02 \pm 0,01)$ OD betragen kann. Bei jedem Assay befinden sich die Differenz-OD innerhalb dieser Werte und sind somit als Messungenauigkeit der Photometer zu werten. Die Befundung der Proben ist von diesen Differenzen wie in den o.g. Tabellen ersichtlich nicht berührt.

⁶⁶ Vgl. hierzu auch Anhang B, Tabelle 88, S. B-58

⁶⁷ Vgl. Anhang B, Tabelle 76, S. B-43 und Tabelle 79, S. B-46; Tabelle 80, S. B-48 und Tabelle 83, S. B-51; Tabelle 84, S. B-53 und Tabelle 87, S. B-56

⁶⁸ Vgl. BioTek® Instruments, Inc.: www.biotek.de, 2011 und Tecan Trading AG: www.tecan.com, 2011

2.3.5 Gesamtergebnis Photometer

Die Funktionstauglichkeit des Photometers ist durch die erfolgreiche Kalibrierung sichergestellt. Ebenfalls werden sämtliche Validierungsparameter zur vollsten Zufriedenheit erfüllt.

Tabelle 9: Übersicht der Ergebnisse der Validierung des Photometers.

	BVD Ag	IBRgB	IBRgE
Plattenlayout			
Plattenbelegung	OK	OK	OK
Validierungsgrundlagen	OK	OK	OK
Berechnungsgrundlagen	OK	OK	OK
CutOFF - Werte	OK	OK	OK
Befundung	OK	OK	OK
Datenübertragung	OK	OK	OK
Zuordnung			
Ausdruck	OK	OK	OK
Messwertdatei	OK	OK	OK
Log-Files	OK	OK	OK
Kontrolle Datenübertragung	OK	OK	OK
Messergebnisse	OK	OK	OK

2.4 Testläufe

Als abschließendes Verfahren werden diverse Testläufe mit definierten Seren durchgeführt. Ziel ist der Nachweis der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Dabei wird auch geprüft, ob ein verschleppungsfreies Dispensieren gewährleistet ist.

2.4.1 Parallele Abarbeitung definierter Proben manuell – ELISA-Roboteranlage

Von der Fa. IDEXX GmbH werden die Assays IBRgE und BVD Ag zum Austesten kostenlos zur Verfügung gestellt. Sie enthalten alle notwendigen Reagenzien und MTP zur Versuchsdurchführung. Allerdings ist das Mindesthaltbarkeitsdatum dieser Assays bereits überschritten. Zur Prüfung der o.g. Kriterien sind sie noch verwendbar.

Durchführung:

Für die Testläufe werden jeweils negativ getestete Proben in einem Pool zusammengefasst. Positiv getestete Proben bilden einen zweiten Pool. Für die fraglichen Proben existiert nur sehr wenig Probenmaterial, so dass der interne Standard⁶⁹ (IS) für diesen Messbereich verwendet wird.

Es werden zwei verschiedene Ansatzschemata je Assay getestet. Im ersten Schema⁷⁰ wird die Reproduzierbarkeit innerhalb einer Nadel (horizontale Reproduzierbarkeit) als auch zwischen den Nadeln (vertikale Reproduzierbarkeit = Intra-Platten Variation) getestet. Hierfür ist eine MTP ausreichend.

Im zweiten Ansatzschema⁷¹ soll die Reaktion einer Probe an verschiedenen Positionen einer MTP getestet werden. Desweiteren soll geprüft werden, ob das Ergebnis der Probe über mehrere MTP gleich bleibt (Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz = Bestimmung der Inter-Platten Variation).

Beide Ansatzschemata werden je Assay in ausreichender Menge in einer **Deepwellplatte** vorbereitet. Von dieser werden mittels einer Mehrkanalpipette die Seren auf die entsprechenden MTP übertragen. Dieses Verfahren stellt sicher, dass sich an identischen Positionen die gleichen Seren befinden.

⁶⁹ Der interne Standard wurde aus stark positivem Probenmaterial derart verdünnt, dass er im fraglichen Bereich reagiert.

⁷⁰ s. Tabelle 89, S. B-59

⁷¹ s. Tabelle 90, S. B-59

2.4.1.1 IBRgE⁷²

Die horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit ist bei diesem Assay für das gegebene Alter der MTP und Reagenzien sehr gut. Die zufällige Messabweichung liegt immer unter $\pm 0,01$ OD. Dies ist mehr als ausreichend für diesen Assay: Der IBRgE dient der Erkennung von an BHV-1 erkrankten Tieren. Der Assay ist daher sehr sensitiv konzipiert, d.h. dass alle positiven Tiere auch als solches erkannt werden. Daher reagiert auch der IS als schwach positiv anstatt fraglich.

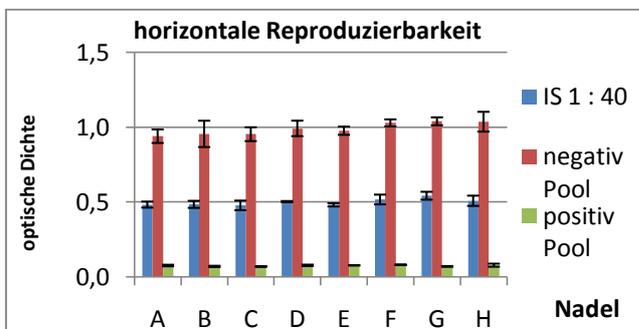


Abbildung 13: Horizontale Reproduzierbarkeit bei IBRgE.
Die Fehlerindikatoren sind bei allen Proben innerhalb einer Nadel klein, entsprechend ist die Reproduzierbarkeit hoch.

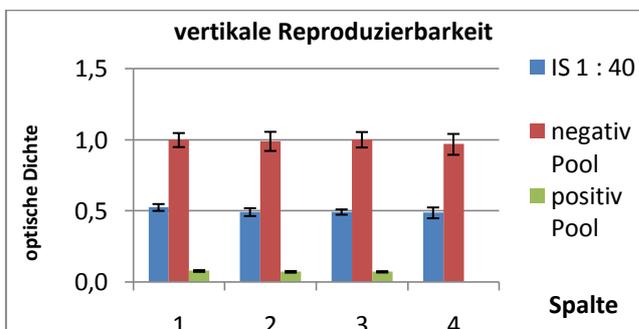


Abbildung 14: vertikale Reproduzierbarkeit bei IBRgE.
Die Fehlerindikatoren zwischen den Nadeln sind sehr klein, entsprechend ist die Reproduzierbarkeit sehr hoch.

Die Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz ist unter den gegebenen Umständen ebenfalls sehr gut. Sowohl der schwach und der stark positive Pool als auch der negative Pool wurden stets als solches erkannt. Der IS ist bei den meisten MTP ebenfalls als fraglich bzw. schwach positiv erkannt worden. Ausnahme bildet hier die MTP 142758. Bei dieser MTP liegen die reinen OD-Werte für die negativen Kontrollen um knapp 0,2 OD höher als bei den anderen MTP. Dadurch erhöht sich der P/N – Wert der positiven Kontrollen und der restlichen Proben. Eine mögliche Erklärung liefert das Alter der MTP und der Reagenzien.

⁷² Die vollständigen Datensätze finden sich in Anhang B, Tabelle 95 - Tabelle 99, S. B-61 ff.

Tabelle 10: Diskussion Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE.

Die zufällige Messabweichung über alle MTP bezieht sich auf die Bearbeitung durch die ELISA-Anlage. Die Werte der manuellen Bearbeitung wurden nicht mit einbezogen. Sie beträgt weniger als $\pm 0,1$ OD. Zwischen den MTP werden meist identische Ergebnisse mit sehr geringer Messabweichung erzielt.

Mittelwerte	142756	142757	142758	142759	manuell 142760	Mittelwert	zufällige Messab- weichung alle MTP
IS 1 : 40	0,612	0,580	0,701	0,549	0,575	0,610	0,07
schwach positiv	0,301	0,280	0,350	0,269	0,294	0,300	0,04
stark positiv	0,090	0,084	0,109	0,081	0,113	0,091	0,01
negativ	1,169	1,121	1,441	1,109	1,255	1,210	0,16
zufällige Messab- weichung	142756	142757	142758	142759	manuell 142760		
IS 1 : 40	0,017	0,031	0,048	0,029	0,021		
schwach positiv	0,014	0,015	0,029	0,016	0,009		
stark positiv	0,005	0,005	0,010	0,008	0,020		
negativ	0,077	0,069	0,094	0,056	0,056		

Die MTP 142760 wurde parallel zu den anderen MTP manuell bearbeitet. Es zeigt sich, dass sich die Messergebnisse und somit auch die Beurteilung der Proben der ELISA-Roboteranlage mit denen der manuellen Bearbeitung decken. Die Streuung der Mittelwerte eines Pools in der zweiten Dezimalstelle sowohl innerhalb einer MTP als auch über mehrere MTP ist akzeptabel, da die Beurteilung der Proben in dieser Größenordnung nicht beeinträchtigt wird.

2.4.1.2 BVD Ag

Die Testläufe von diesem Assay sind nicht auswertbar, da die OD-Werte der Kontrollen außerhalb der jeweiligen Grenzwerte liegen (vgl. Tabelle 7, S. 26):

Tabelle 11: Ergebnistabelle der Kontrollen für den Testlauf BVD Ag.

CNEG_KO = negative Kontrolle, CPOS_KO = positive Kontrolle.

MTP 702829 entspricht dem Ansatzschema für die horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit, alle anderen entsprechen dem Ansatzschema für die Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz. MTP 702834 wurde manuell abgearbeitet und dient als Referenz.⁷³

	702829	702835	702836	702837	702838	702834
A1: CNEG_KO	-0,172	0,117	0,155	0,888	0,357	0,060
B1: CNEG_KO	-0,127	0,173	0,059	0,084	0,069	0,059
C1: CPOS_KO	-0,360	-0,008	0,818	0,823	0,881	0,782
D1: CPOS_KO	-0,325	0,033	0,818	0,660	0,887	0,774

Bei MTP 702829 und 702835 liegen die OD-Werte der positiven Kontrollen im negativen Bereich, während bei den MTP 702837 und 702838 die einzelnen OD-Werte der

⁷³ Die vollständigen Datensätze finden sich in Anhang B, Tabelle 100, S. B-62

negativen Kontrollen an Position A1 jeweils im positiven Bereich liegen. Die Validierungsgrundlagen sind somit bei diesen vier MTP nicht erfüllt und die Ergebnisse damit nicht verwertbar. Bei MTP 702835 und 702836 sind die OD-Werte der negativen Kontrolle an Position A1 zwar noch im negativen Bereich, aber im Vergleich zum Referenzansatz (702834) unakzeptabel stark erhöht. Beim Referenzansatz sind die OD-Werte aller Kontrollen innerhalb der vorgegebenen Grenzen. Die Kontrollen der MTP 702834-702838 sind aus derselben Deepwellplatte pipettiert worden. Somit beweist die Referenzplatte, dass der Zustand der Proben und Kontrollen in Ordnung ist und der Fehler nicht bei diesen liegt.

2.4.1.3 Diskussion

Die Ursache für die Invalidität der OD-Werte der Kontrollen bei BVD Ag kann in einer Fehlfunktion der Washer oder der Dispenser begründet sein. Um die Washer auszuschließen, werden die Einstellungen der Waschprogramme sowie die Aspirationshöhen visuell geprüft und ein Kontrolltest durchgeführt. Bei diesem werden die Reagenzien manuell pipettiert. Je Washer wird eine MTP angesetzt. Aus praktischen Gründen wird das Ansatzschema für die Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz verwendet. Die Messung erfolgt im Photometer der Fa. BioTek.

Tabelle 12: Ergebnistabelle Überprüfung Washer.

CNEG_KO = negative Kontrolle, CPOS_KO = positive Kontrolle. Jede MTP wurde exakt einem Washer zugeordnet: 702847: Washer 1; 702848: Washer 2; 702849: Washer 3. Die OD-Werte aller Kontrollen liegen im geforderten Bereich. Dies bedeutet, dass das Waschergebnis einwandfrei ist.⁷⁴

	702847	702848	702849
CNEG_KO	0,067	0,088	0,077
CNEG_KO	0,063	0,078	0,074
CPOS_KO	0,962	1,014	0,936
CPOS_KO	0,911	1,009	0,921

Die Ergebnisse der Kontrollen liegen innerhalb der Grenzwerte. Auch die Ergebnisse der jeweiligen Proben sind stets identisch. Die zufälligen Messabweichungen liegen in einem tolerierbaren Bereich, obwohl die Abweichungen bei den stark positiven Proben relativ hoch sind. Diese Abweichungen haben eine technische Ursache: Der dynamische Bereich des Photometers liegt zwischen 0 und 4,0 OD⁷⁵. Daher können sehr hohe Antigen-Konzentrationen der Proben nur noch ungefähr erfasst werden. Die Abweichungen zwischen den MTP bewegen sich nahe Null. Somit ist eine einwandfreie Funktion der Washer gewährleistet.

⁷⁴ Die zugehörigen Datensätze finden sich in Anhang B, Tabelle 101, S. B-64

⁷⁵ Vgl. BioTek® Instruments, Inc.: www.biotek.de, 2011

Tabelle 13: Mittelwerte und zufällige Messabweichung aus Überprüfung der Washer.

111111 = Pool stark positiver Proben, 222222 = Pool schwach positiver Proben, 333333 = Pool interner Standard, 333334 = Pool fraglicher Proben, 444444 = Pool negativer Proben. Dargestellt sind die S-N – Werte.

Mittelwerte	702847	702848	702849	zufällige Messabweichung
111111	3,759	3,790	3,752	0,02
222222	0,256	0,252	0,248	0,00
333333	0,092	0,094	0,097	0,00
333334	0,456	0,468	0,451	0,01
444444	-0,024	-0,028	-0,030	0,00

zufällige Messabweichung	702847	702848	702849
111111	0,17	0,17	0,15
222222	0,02	0,02	0,02
333333	0,01	0,02	0,03
333334	0,03	0,02	0,02
444444	0,01	0,01	0,01

Eine weitere Fehlerquelle können die Dispenser darstellen. Diese können trotz durchgeführter Reinigungsprozesse verschmutzt sein. Zur Prüfung wird ein sogenannter Leerlauf durchgeführt. Unter Verzicht auf Probenmaterial und Kontrollen werden alle Bearbeitungsschritte dieses Assays auf eine unbeschichtete Flachboden-MTP ohne Bindungskapazität (**BK**) angewendet. Nach den grundlegenden Prinzipien des ELISA (vgl. Anhang 1, S. A-1 ff.) darf keinerlei Farbreaktion erfolgen. Tatsächlich wurden positive Reaktionen in den Reihen A und H festgestellt. Dies bedeutet, dass ein oder mehrere Bearbeitungsschritte der ELISA-Roboteranlage fehlerhaft sein müssen. Zur Identifizierung wurde ein Versuch mit 3 Flachboden-MTP unter Verzicht auf Probenmaterial und Kontrollen durchgeführt: Bei jeder MTP wurde nur jeweils ein Dispensierschritt von der ELISA-Roboteranlage ausgeführt. Alle anderen erfolgten jeweils manuell:

Tabelle 14: Versuchsschema Überprüfung Dispenser.

	MTP 1	MTP 2	MTP 3
Zugabe Konjugat	ELISA-Roboteranlage	manuell	manuell
Zugabe Substrat	manuell	ELISA-Roboteranlage	manuell
Zugabe Stopplösung	manuell	manuell	ELISA-Roboteranlage

Eine positive Reaktion erfolgt nur bei MTP 2⁷⁶:

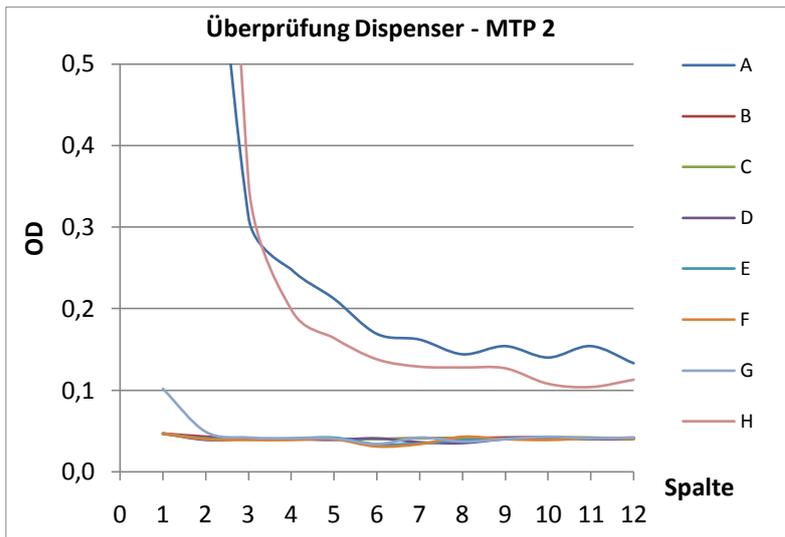


Abbildung 15: Ergebnisse des Dispensertests.

Nadel A, G und H zeigen in den ersten Spalten erhöhte OD-Werte, diese nehmen von Spalte zu Spalte ab.

In Spalte 1 zeigen die Nadeln A, G und H positive Reaktionen, wobei der OD von Nadel G bei 0,102 liegt. Die restlichen Positionen zeigen einen OD von $(0,041 \pm 0,00)$. Dieser Wert liegt unterhalb des Wertes der negativen Kontrolle (vgl. Anhang B, Tabelle 100, S. B-62).

Nach den grundlegenden Prinzipien des ELISA-Tests (vgl. Anhang I, S. A-1 ff.) liegt die Schlussfolgerung nahe, dass dieser Kamm mit Konjugat verunreinigt sein muss. Eine Erklärung für die mögliche Kontamination trotz getrennter Schlauchsysteme kann die Feineinstellung der Dispensernadeln durch den Hersteller während der Validierungsarbeiten liefern: Dafür wurden sämtliche Käme ausgebaut und dem Hersteller zur Verfügung gestellt. Die Kalibrierung und somit auch die Vergabe von Inventarnummern erfolgte erst anschließend. Vorher wurden allerdings schon Reagenzien für Testzwecke verwendet.

Es wurden verschiedene Maßnahmen zur Entfernung der Konjugat-Reste durchgeführt. Nach jedem Reinigungsversuch erfolgt jeweils ein Kontrollversuch. Dabei wird eine Flachboden-MTP ohne BK verwendet, es wird auf Probenmaterial und Kontrollen verzichtet. Das Substrat wird von Dispenser 2, Kamm 2 dispensiert, alle anderen Bearbeitungsschritte erfolgen manuell.

Die Denaturierung der Konjugatproteine mit 1N Schwefelsäure wurde von Frau Rammelt der Fa. IDEXX GmbH empfohlen. Als weiteres Denaturierungsmittel wird nach

⁷⁶ Datensatz vgl. Anhang B, Tabelle 102, S. B-66

Karlson et. al (1988) 70% Ethanol als organisches Lösungsmittel eingesetzt⁷⁷. Im nächsten Schritt wird versucht, sämtliche Konjugatreste durch das Einweichen mit Substrat zu entfernen:

Tabelle 15: Übersicht Reinigungsmaßnahmen.

Maßnahme	Ergebnis
Ultraschallbad (Mucosol)	Ohne Erfolg
1 N H ₂ SO ₄ <ul style="list-style-type: none"> - Spülen - Einwirkzeit 10min - Einwirkzeit 30min - Einwirkzeit 60min - Einwirkzeit 120min - Einwirkzeit 240min mit Spülen nach 120min 	<ul style="list-style-type: none"> - Ohne Erfolg
70% Ethanol <ul style="list-style-type: none"> - Einwirkzeit 240min mit Spülen nach 120min - 18h Tauchbad gesamter Dispenserkopf 	<ul style="list-style-type: none"> - Ohne Erfolg - Ohne Erfolg
Substrat <ul style="list-style-type: none"> - Einwirkzeit 1 Tag - Einwirkzeit 2 Tage - Einwirkzeit 4 Tage 	<ul style="list-style-type: none"> - Ohne Erfolg - Ohne Erfolg - Ohne Erfolg

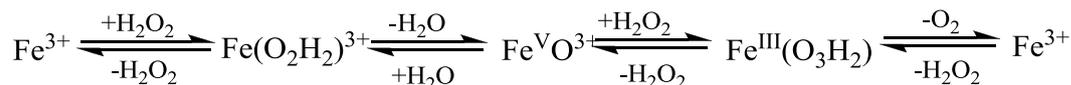
Nach Absprache mit Dr. A. Siewing (Diplom-Chemikerin im Fachbereich 32 des VI OL) sollte eine Denaturierung in einem Tauchbad mit einer Lösung aus den gleichen Volumen von 1N Salzsäure und 3N Schwefelsäure erfolgen. Während des Prozesses werden Luftblasen an den Verschlusschrauben der Kämmen beobachtet. Es erfolgte ein sofortiger Abbruch. An den Innenseiten der Verschlusschrauben wird eine rotbraune Ablagerung festgestellt. Diese findet sich auch an den Innenseiten sowie an den Verschraubungen und tlw. auch an den Nadeln (sowohl außerhalb als auch innerhalb des Hartplastikblocks) der Kämmen von Dispenser 1 und Dispenser 3.



Abbildung 16: Verschlusschrauben der Dispenser 3. Es ist deutlich eine rotbraune Verfärbung an sämtlichen Verschlusschrauben zu erkennen.

⁷⁷ Vgl. Karlson et. al: „Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler“, 1988, S. 47

Nach Holleman und Wiberg⁷⁸ kann Wasserstoffperoxid auch von Fe^{3+} -Ionen nach dem „Krema-Stein-Mechanismus“ in Wasser und Sauerstoff gespalten werden:



Der dabei entstehende Sauerstoff kann gleichfalls der Enzym-katalysierten Reaktion (s. Anhang A, S. A-1 f.) TMBH_2 zu seinem blauen Produkt (TMB) oxidieren. Um eine positive Reaktion hervorzurufen müssten sich demnach lösliche Fe^{3+} -Ionen an der Oberfläche der Verschlusschrauben befinden.

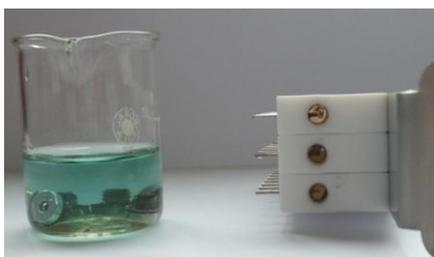


Abbildung 17: Reaktion der Verschlusschrauben von Dispenser 3 und Substrat. Eine Blaufärbung setzte innerhalb weniger Minuten ein. Gut erkennbar sind auch die rotbraunen Verfärbungen der Verschlusschrauben an den Kammern.

Eine Inkubation der Verschlusschrauben mit Substrat scheint die These vom „Krema-Stein Mechanismus“ zu stützen: Die Lösung nahm nach wenigen Minuten eine blaue Färbung an. Die Verschlusschrauben-Substrat-Reaktionsthese wird auch durch den „Leerlaufversuch“ (vgl. S. 34) bei der Überprüfung der Dispenser bestätigt: Zum einen fanden positive Reaktionen nur bei der Substratzugabe durch die ELISA-Roboteranlage statt. Zum anderen fanden diese auch nur in den Reihen A, G und H statt. Diese Reihen werden durch die Nadeln dispensiert, welche sich in der Nähe der Verschlusschrauben befinden.

Auch der beobachtete Verdünnungseffekt (s. Abbildung 15, S. 35) bestätigt die These: Das Röhrensystem im Dispenserkamm ist stets mit Substrat gefüllt. Bei jedem Dispensierschritt wird jeweils so viel Substrat in den Dispenserkamm gedrückt (vgl. Funktionsprinzip Dispenser, Abbildung 5, S. 12), dass jede Nadel genau $100\mu\text{l}$ abgibt. Dies bedeutet, dass in das Röhrensystem $800\mu\text{l}$

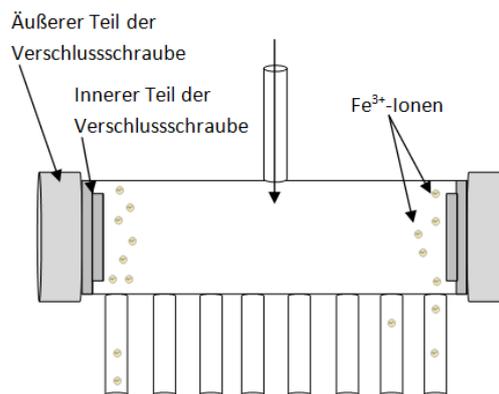


Abbildung 18: Darstellung Verteilung von Fe^{3+} -Ionen im Röhrensystem eines Kamms.

Substrat je Dispensierschritt gepresst werden. Bei einer angenommenen⁷⁹ Kammbreite B von 8cm (entspricht der Breite einer MTP) und einem Durchmesser d der Röhre im Hartplastikblock von $0,5\text{cm}$ ergibt das nach $V_{\text{Zyl}} = \frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot B$ ein Innenvolumen von

⁷⁸ Vgl. Holleman, A. F.; Wiberg, N.: „Lehrbuch der Anorganischen Chemie“, 2007, S. 536

⁷⁹ Es sind keine konkreten Angaben seitens des Herstellers zu den genauen Innenmaßen bis zum Abgabetermin der Arbeit möglich gewesen.

1,57ml (bei dieser Berechnung ist das Innenvolumen der Nadeln und des Zulaufschlauchs im Bereich Ventil-Nadeln noch nicht enthalten). Das bedeutet, dass nicht die gesamte Flüssigkeit aus dem Röhrensystem bei einem Dispensierschritt verdrängt wird und dadurch nicht alle gelösten Fe^{3+} -Ionen beim ersten Dispensierschritt abgegeben werden.

Bereits direkt nach dem Dispensieren der MTP wurde eine blassblaue Verfärbung an Position A1 festgestellt. Diese Verfärbung wurde während der Inkubationszeit intensiver und entstand auch in den anderen Kavitäten von Reihe A, sowie in Reihe G und H. Dies weist daraufhin, dass durch das Substrat Fe^{3+} -Ionen in Lösung gehen, im Röhrensystem teilweise schon mit dem Substrat nach dem „Krema-Stein-Mechanismus“ reagieren und bei jedem Dispensierschritt mit in die Kavitäten abgegeben werden. Dort findet die weitere Umsetzung von Wasserstoffperoxid und somit die Umsetzung von TMBH_2 zu seinem blauen Oxidationsprodukt statt. Dabei ist die umgesetzte Substratmenge pro Zeiteinheit abhängig von der Konzentration der Fe^{3+} -Ionen in der jeweiligen Kavität.

Die genaue Ursache der Bildung von Fe^{3+} -Ionen ist derzeit noch nicht geklärt. Allerdings sollte der Einsatz von eisenfreien Teflonschrauben das Problem umgehen. Auch ein Einsatz von Teflon-Nadeln bzw. von Teflon-beschichteten Nadeln ist unter diesen Gesichtspunkten ratsam.

2.4.2 Ausblick

An dieser Stelle findet zunächst ein Abbruch der Validierungsarbeiten bis zur firmenseitigen Problembekämpfung statt. Nach einem erfolgreichen Abschluss des Validierungspunktes 2.4.1 für alle Assays müssen Vergleichsansätze mit aktuellen Proben erfolgen. Dazu werden jeweils 2 MTP identisch mit Proben und Kontrollen belegt. Die Abarbeitung erfolgt einmal manuell, einmal durch die ELISA-Roboteranlage. Dabei sollen die Log-Files hinsichtlich der Einhaltung der Inkubationszeiten, die Datenübertragung an das LIMS sowie das Erstellen der Messfiles geprüft werden.

Neben der Beweisführung von übereinstimmenden Messergebnissen und damit auch identischer Befundung im Vergleich zur manuellen Bearbeitung soll für jeden Assay der Variationskoeffizient CV sowohl für die Intra-Platten Variation als auch für die Inter-Platten Variation bestimmt werden.

Für den Assay BVD Ag wird für stark positive Proben nach dem „Validation Data Report“⁸⁰ für die Intra-Platten Variation ein durchschnittlicher CV von 4,6% erwartet. Die-

⁸⁰ Vgl. IDEXX Laboratories, Inc.: „BVDV AgS“, 2005, S. 2 ff.

ser kann in einer Spalte bis zu 6,6% betragen. Der CV für die Inter-Platten Variation wird für stark positiven Proben bei 6,7% und für schwach positive Proben bei maximal 8,9% erwartet. Für diesen Assay wird eine hohe **Spezifität** und **Sensitivität** angegeben⁸¹. Daher sollten alle negativen Proben sowie alle positiven Proben als jeweils solche identifiziert werden.

Für den Assay IBR gB wird nach dem „Validation Data Report“⁸² für die Intra-Platten Variation ein durchschnittlicher CV von 5,3% erwartet. Dieser kann in einer Spalte bis zu 9,5% betragen. Bei der Inter-Platten Variation wird bei stark positiven Proben ein durchschnittlicher CV von 0,4%, bei schwach positiven Proben von bis zu 8,3% erwartet. Auch bei diesem Assay wird eine hohe Spezifität und Sensitivität angezeigt⁸³, so dass eine korrekte Identifizierung negativer und positiver Proben erwartet wird.

Für den Assay IBR gE wird nach dem „Validation Data Report“⁸⁴ für die Intra-Platten Variation ein durchschnittlicher CV von 4,4% erwartet. Dieser kann in einzelnen Reihen bis zu 5,2% betragen. Bei der Inter-Platten Variation wird ein durchschnittlicher CV von 6,3% bei negativen Proben und für positive Proben von 9,5% erwartet. Auch bei diesem Assay wird eine hohe Sensitivität und Spezifität angegeben⁸⁵, so dass ebenfalls eine korrekte Identifizierung negativer und positiver Proben erwartet wird.

⁸¹ Ebd., S. 5 + S. 8

⁸² Vgl. IDEXX Laboratories, Inc.: „IBR gB“, 2003, S. 2 ff.

⁸³ Ebd., S. 6 + S. 11

⁸⁴ Vgl. IDEXX Laboratories, Inc.: „IBR gE“, 2004, S. 2 ff.

⁸⁵ Ebd., S. 6 f. + S. 10 f.

3 Fazit

Die ELISA-Roboteranlage erfüllt soweit die technischen Voraussetzungen zur Bearbeitung der geforderten Assays. Die Zuordnung der Reagenzien bei den Washern und Dispensern funktioniert einwandfrei über die Zuordnung der Kanäle zu den Assays. Allerdings ist bei einem Neuanschluss der Waschcontainer stets auf eine korrekte Schlauchführung zu achten und ggf. eine Überprüfung vor Verwendung durchzuführen. Desweiteren ist auf eine eindeutige Beschriftung der Schläuche der Washer sowie der Positionen der Reagenzflaschen zu achten. Dem Benutzer muss stets bewusst sein, dass ein Vertauschen von Reagenzien unmittelbar zu invaliden Ergebnissen führt. Gleiches gilt für die Reinigungsprozeduren. Sie bilden die Grundlage gleichmäßig korrekter Ergebnisse und sind daher unbedingt sachgemäß durchzuführen. Der Schulungsprozess sollte aber durch die benutzerfreundliche Oberfläche der Software sowie eine gute Beschriftung aller Positionen mit relativ geringem Aufwand möglich sein.

Bezüglich der Dispenser ist zu bedenken, dass bei einem Austausch der Nadeln bauliche Veränderungen vorgenommen werden, die u.U. das Fließverhalten der Reagenzien verändern können. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass die bisherigen Daten der Justierung und Kalibrierung noch Gültigkeit haben und somit wie 2.2.3 beschrieben diese Prozeduren zu wiederholen sind. Vorab sollte ein Materialtest durchgeführt werden: Sämtliche Bauteile der Dispenser, die mit Reinigungslösungen und Reagenzien in Kontakt stehen, sollten auf Beständigkeit mit der Reinigungslösung getestet werden. Anschließend muss geprüft werden, ob es zu Interaktionen zwischen den Reagenzien und den neuen Materialien kommt. Hierfür kann der „Dispensertest“ von S. 34 verwendet werden. Desweiteren ist die Gleichmäßigkeit der Dispension wie bei der Funktionstauglichkeitsprüfung unter 2.2.2.3, S. 16 f. vorzunehmen.

Glossar

a.dem

demineralisiertes Wasser 6

Ablaufzeit

Zeit, die der Meniskus einer Flüssigkeit benötigt, um von der obersten Füllposition einer Pipette zur Spitze zu gelangen. 17

AG

Antigen, *hier* spezifisches Oberflächeneiweiß von Viren und Bakterien 1

AK

Antikörper

körpereigenes, spezifisch gegen Antigene gerichtetes Eiweiß 1

Analysenwaage

Feinwaage mit einer Auflösung von 0,01mg mit Vollglaswindschutz. 18

Anwenderjustierung

Ableichen unter ausschließlicher Verwendung der Hilfsmittel, die dem Anwender zur Verfügung stehen. Die Justierung erfordert Eingriffe, die das Messgerät für darauf folgende Messungen verändertg [DIN EN ISO 8655, Teil 1, S. 6 (5)]. 17

Assay

Untersuchungstest..... 2

Befundung

Aussage über die Reaktion der Probe..... 4

BHV-1

Bovines Herpes Virus Typ 1

Dieses Herpes - Virus des Rindes ist Erreger der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis.. 3

Bindungskapazität

Vermögen Material an die Wandungen zu binden 34

BVDV

Bovines Virus Diarrhoe Virus

viraler Durchfallerreger des Rindes..... 3

Carrier

Transportschiene für MTP..... 12

Deepwellplatte

Kleine Kunststoffplatte ähnlich einer MTP mit einem Fassungsvermögen von 1000µl je Vertiefung..... 30

ELISA

Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (engl.

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest) 2

Glykoprotein

spezifische zuckerhaltige Oberflächenstruktur von Zellen und Viren A-4

IBR

Infektiöse Bovine Rhinotracheitis 2

Inkubationszeit

Zeit, in der die Proben/Reagenzien mit der Testplatte/Probe reagieren. 25

Inkubator

Einheit zur Aufbewahrung der Mikrotiterplatten bei bestimmten Temperaturen 2

interner Standard

fraglich bzw. schwach positiv reagierendes Probenmaterial..... 26

Kalibrierung

Tätigkeiten zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen dem dosierten Volumen und dem zugehörigen Nennvolumen oder gewählten Volumen des Gerätes. Die Kalibrierung

erfordert keine Eingriffe, die das Gerät bleibend verändern [DIN EN ISO 8655, Teil 1, S. 7 (5)].	17
Kavität	
Beschichtete Vertiefung einer Mikrotiterplatte, in die Proben, Kontrollen und Reagenzien pipettiert werden.	5
Konjugat	
Reagenz im ELISA, enthält je nach Assay anti-Speziesimmunoglobuline oder Antikörper, beides jeweils mit einem Enzym [meist Meerrettichperoxidase] gekoppelt..	4
LAVES	
Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit	1
letal	
tödlich	2
LIMS	
Labor Informations Management System	27
Log-Files	
Ereignisprotokolldatei	3
Mikrotiterplatten (MTP)	
Kleine Kunststoffplatte mit in Reihen und Spalten organisierten Vertiefungen für Kontrollen und Proben.	4
monoklonale Antikörper	
Antikörper, die von identischen Zellen (Zellklone) gebildet werden und gegen ein einziges Epitop gerichtet sind.	A-3
Nennvolumen	
Volumen, das vom Hersteller festgelegt und für die Identifizierung und die Angabe des Messbereichs verwendet wird [DIN EN ISO 8655, Teil 1, S. 6 (5)].	17
optische Dichte	
Maß für die Abschwächung der Lichtintensität	15
Pipette	
Gerät zur manuellen Abgabe von bestimmten Volumina	3
Plasma	
Flüssiger Bestandteil des Blutes mit Fibrinogen (Bluteiweiß)	1
Plattenlayout	
Schema der Positionen von Kontrollen und Proben auf einer Testplatte	3
Prüfung	
Technischer Vorgang, der aus dem Bestimmen eines oder mehrerer Merkmale eines bestimmten (...) Verfahrens (...) besteht und gemäß einer vorgeschriebenen Verfahrensweise durchzuführen ist.[Thalmann ‚Qualitätsmanagementhandbuch‘, Teil 3, SOP 05-6, 2009 S. 2]	3
Sensitivität	
Anteil der als positiv identifizierten Tiere in einer positiven Population. ->Richtig-Positiv-Rate	39
Serum	
Flüssiger, nicht gerinnungsfähiger Bestandteil des Blutes	1
Spektralphotometer	
Gerät zur Messung der optischen Dichte von Flüssigkeiten	2
Spezifität	
Anteil der als negativ getesteten Tiere in einer negativen Population. -> Richtig-Negativ-Rate	39
Stopplösung	
Reagenz im ELISA, oft eine Säure oder ein Detergens, beendet die Enzym-Substratreaktion	4
Substrat	

Reagenz im ELISA, dass die Reaktion sichtbar macht. Enthält Wasserstoffperoxid und ein Chromogen [Farbstoff], dieses ist oft TMB.	4
systematische Messabweichung	
Abweichung des dosierten Volumens vom Nennvolumen [DIN EN ISO 8655, Teil 1, S. 5 (5)].	20
Validierung	
Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine spezifisch beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind.[Thalmann ‚Qualitätsmanagementhandbuch‘, SOP 05-6, 2009, Seite 2].....	3
Wartezeit	
Zeit, die die Restflüssigkeit benötigt, um von der Pipettenwand abzufließen.	17
Washer	
Gerät zum Auswaschen der einzelnen Positionen einer Testplatte	2
Waschgerät	5
zufällige Messabweichung	
Streuung der dosierten Volumina um den Mittelwert der dosierten Volumina [DIN EN ISO 8655, Teil 1, S. 5].....	16

Literaturverzeichnis

- Bio Tek Instruments, Inc.** www.biotek.de [Online] // ELx405 Mikroplatten Washer. - BioTek Instruments, Inc., 2011. - 11. Mai 2011. - http://www.biotek.de/de/products/liquid_handling/elx405_microplate_washer.html.
- BioTek Instruments, Inc.** ELx405TM Microplate Washer Operator's Manual [Buch]. - 2008.
- BioTek Instruments, Inc.** PowerWave TM Microplate Spectrophometer, Operator's Manual. - 2009. - Bd. 7281000.
- BioTek Instruments, Inc.** www.biotek.de [Online] // PowerWave Mikroplatten Spektralphotometer. - BioTek Instruments GmbH, 2011. - 06. Juni 2011. - http://www.biotek.de/de/products/microplate_detection/powerwave_microplate_spectrophotometer.html.
- Decon Laboratories Unlimited** www.decon.co.uk [Online] // Decon Laboratories Unlimited. - o.J.. - 12. Mai 2011. - <http://www.decon.co.uk/german/decon90.asp>.
- DIN Deutsches Institut für Normung e.V.; Normenausschuss FNLa und NaMed** DIN EN ISO 8655. - Berlin : Beuth Verlag GmbH, 2002. - Bd. 12. - ICS 17.060; 71.040.20.
- DIN Deutsches Institut für Normung e.V.; Normenausschuss Qualitätsmanagement, Statistik und Zertifizierungsgrundlagen im DIN und VDE** DIN EN ISO / IEC 17025 [Buch]. - Berlin : Beuth Verlag GmbH, 2005. - ICS 03.120.20; 19.020.
- Holleman A. F. und Wiberg Nils** Lehrbuch der Anorganischen Chemie [Buch]. - Berlin : Walter de Gruyter, 2007. - Bd. 102. Auflage.
- IDEXX GmbH** www.idexx.de [Online] // ELISA Technisches Handbuch. - IDEXX Laboratories, Inc., 2011. - 11. Mai 2011. - http://www.idexx.de/pubwebresources/pdf/de_de/livestock-poultry/elisa-technical-guide-brochure-de.pdf.
- IDEXX LABORATORIES** Gebrauchsinformation Herdchek* Bovine Rhinotracheitis Virus (BHV-1) gE Ab . - Ludwigsburg : [s.n.], 2010.
- IDEXX LABORATORIES** Gebrauchsinformation HERDCHEK* BVDV Ag/SerumPlus . - Ludwigsburg : [s.n.], 2010. - Zul.Nr. BGVV- B230.
- IDEXX LABORATORIES** Gebrauchsinformation HerdChek* IBRgB. - Ludwigsburg : [s.n.], 2010. - Zul.-Nr.: BGVV-B231.
- IDEXX Laboratories, Inc.** BVDV AgS, Bovine Viral diarrhoea Virus Antigen Serum/Plus Test Kit, Validation Data Report [Bericht]. - Westbrook : IDEXX Laboratories, Inc., 2005.
- IDEXX Laboratories, Inc.** IBR gB, Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus (BHV-1) gB, Validation Data Report [Bericht]. - Westbrook : IDEXX Laboratories, 2003.
- IDEXX Laboratories, Inc.** IBR gE, Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus gE [Bericht]. - Westbrook : IDEXX Laboratories, Inc., 2004.
- IDEXX Laboratories, PAS Technical Service** IDEXX Common Kit Components. - 2010.
- Josephy David, Eling Thomas und Mason Ronald P.** The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine [Artikel] // The Journal of BIOLOGICAL CHEMISTRY. - USA : [s.n.], 1982. - 7 : Bd. 257.
- Karlson Peter [et al.]** Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler [Buch]. - Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 1988. - Bd. 13. neubearbeitete Auflage.
- Kunze Udo R. und Schwedt Georg** Grundlagen der quantitativen Analyse [Buch]. - Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. - Bde. 6., aktualisierte und ergänzte Auflage.
- Mayr Anton [et al.]** Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre [Buch]. - Stuttgart : Ferdinand Enke Verlag, 1993. - Bd. 6. neu bearbeitete Auflage.
- Pelikan Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG** Sicherheitsdatenblatt, Tinte 4001, alle Farben, Glas/Patrone. - 2007. - Bd. 13003.
- Peters Dirk** [Interview]. - Oldenburg : [s.n.], 26. April 2011.
- Ryan Orlaith, Smyth Malcolm R. und Ó Fágáin Ciáran** Horseradish peroxidase: the analyst's friend [Artikel] // Essays in Biochemistry. - London : Portland Press Ltd, 1994. - 28.
- Schrandt Hiltrud** Nds. Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit [Online] // www.laves.niedersachsen.de. - Evercom, 2011. - 06. Mai 2011.

Tecan Trading AG www.tecan.com [Online] // Sunrise TM. - Tecan Trading AG, 2011. - 06. Juni 2011. -
<http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=1261&ID=684&Menu=1&Item=21.2.10.4.1>.
Thalmann Prof. Dr. Qualitätsmanagementhandbuch des Veterinärinstituts Oldenburg [Buch]. - Oldenburg : [s.n.], 2009. - 7.

A. Anhang A – Erläuterungen und Vorversuche

1 Assays

1.1 Prinzip ELISA

Jeder ELISA hat in seiner Grundstruktur stets folgenden Ablauf:

1. Zugabe der Probe in die Kavitäten der MTP und erste Inkubation
2. Waschen
3. Zugabe von Konjugat und zweite Inkubation
4. Waschen
5. Zugabe von Substrat und dritte Inkubation
6. Zugabe von Stopplösung
7. Messung im Photometer

1.1.1 Indirekter und Direkter ELISA

Beim indirekten ELISA werden die in der Probe enthaltenen Antikörper nachgewiesen. Die Kavitäten der MTP sind mit Antigenen beschichtet, die speziell gegen diese Antikörper gerichtet sind. Die AK der Probe gehen eine feste Verbindung mit den AG der MTP ein.

Nach einer ersten Inkubation wird durch Waschen ungebundenes Material aus den Kavitäten entfernt und anschließend Konjugat zugegeben. An ein anti-Speziesimmunoglobulin ist eine Meerrettichperoxidase gekoppelt. In einer zweiten

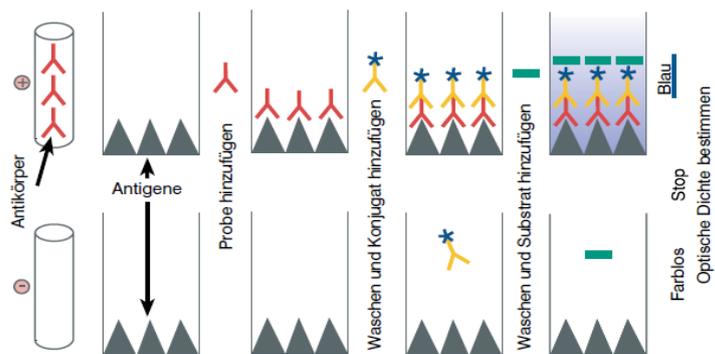
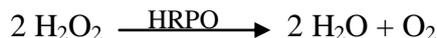


Abbildung 19: Schema indirekter ELISA.

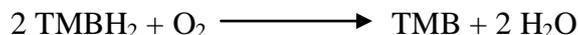
In der Probe enthaltene AK werden zwischen AG der MTP und Konjugat gebunden. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zu der Menge an AK in der Probe. (Quelle: IDEXX GmbH, "ELISA Technisches Handbuch", 2011, S. 2)

Inkubation bindet dieses Konjugat an die AK der Probe. In einem weiteren Waschschrift wird ungebundenes anti-Speziesimmunoglobulinkonjugat entfernt. Es erfolgt die Substratzugabe. Das Substrat enthält Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

Die verbliebene Meerrettichperoxidase (HRPO) katalysiert die Reaktion von TMB und H_2O_2 unter Farbentwicklung: Die Häm-Gruppe der HRPO wird oxidiert und H_2O_2 wird dabei unter Bildung von Wasser und Sauerstoff reduziert⁸⁶:



Dabei wird TMB zu seinem blauen Reaktionsprodukt unter Bildung von Wasser oxidiert⁸⁷:



Entscheidend für die katalytische Reaktion ist das hämolytische Zentrum von HRPO mit dem zentralen Fe^{2+} -Ion: An diesem kann Sauerstoff reversibel binden, ohne Fe^{2+} zu oxidieren.⁸⁸ Dadurch wird die Zerfallsgeschwindigkeit des ansonsten bei Raumtemperatur metastabilen H_2O_2 stark erhöht.⁸⁹ Die durch das oxidierte TMB entstehende Farbentwicklung ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Enzyms und damit auch zu der Menge der in der Probe enthaltenen Antikörper. Die Stopplösung enthält entweder das schwefelsäurehaltige Detergens Natrium-Dodecylsulfat (SDS) oder eine andere Säure. Beides beendet die Umsetzung von H_2O_2 und somit auch von TMBH_2 , wobei die Säure im Gegensatz zu SDS einen Farbumschlag des blauen TMB nach gelb bewirkt. Die Farbentwicklung kann bei einer Wellenlänge von 450nm für gelb und von 650nm für blau im Photometer gemessen werden⁹⁰.

Bei dem direkten ELISA ist das Prinzip ähnlich. Der Unterschied besteht darin, dass die AG der Probe nachgewiesen werden und die Kavitäten mit AK beschichtet sind. Das Konjugat bindet dabei an die AG der Probe.⁹¹

⁸⁶ Vgl. Ryan et. al: „Horseradish peroxidase: the analyst's friend“, 1994, S. 129 ff.

⁸⁷ Vgl. Josephy et. al: „The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3,5' - Tetramethylbenzidine“, 1982, S. 3669 f.

⁸⁸ Vgl. Karlson et. al: „Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler“, 1988, S. 48 f.

⁸⁹ Holleman, A. F.; Wiberg, N.: „Lehrbuch der Anorganischen Chemie“, 2007, S. 537 f.

⁹⁰ Vgl. Ryan et. al: „Horseradish peroxidase: the analyst's friend“, 1994, S. 129 ff.

⁹¹ Vgl. IDEXX GmbH: „ELISA Technisches Handbuch“, 2011, S. 2 f. und IDEXX LABORATORIES: Gebrauchsinformationen der einzelnen Assays, 2010

1.1.2 Kompetitiver ELISA

Bei dieser Form des ELISA enthält das Konjugat enzymmarkierte Antikörper, die eine Verbindung mit dem Antigen der MTP eingehen können. Daher konkurrieren die Antikörper der Probe mit den Antikörpern des Konjugats um die Bindungsstellen der MTP. Die Farbentwicklung ist daher umgekehrt proportional zu der Menge AK der Probe.⁹²

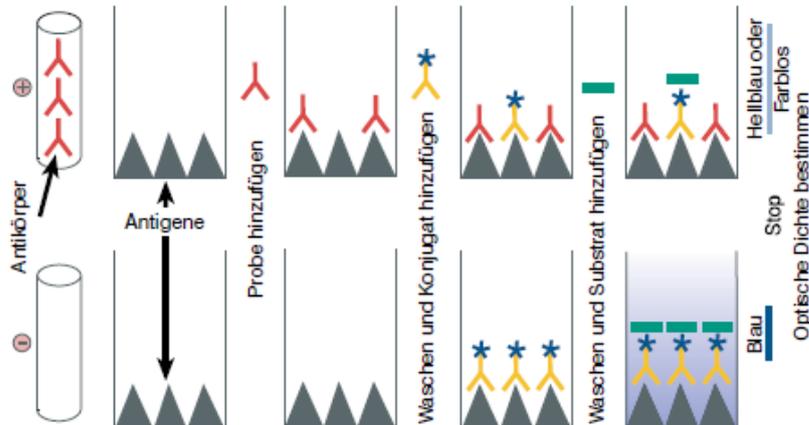


Abbildung 20: Schema kompetitiver ELISA.

Konjugat - AK konkurrieren mit Proben – AK um die Bindungsstelle. Je stärker die Farbentwicklung, desto weniger AK enthält die Probe. (Quelle: IDEXX, „ELISA Technisches Handbuch“, 2011, S. 3)

1.2 Testprinzipien⁹³

1.2.1 BVD Ag

Bei diesem Assay handelt es sich um einen direkten ELISA.

In den Vertiefungen der MTP befinden sich immobilisierte, gegen BVDV gerichtete spezifische **monoklonale Antikörper**. Das Konjugat ist mit dem Enzym Meerrettich – Peroxidase verbunden, welches die Substrat-Chromogen-Lösung unter einer Blaufärbung umsetzt. Die Stopplösung bewirkt neben der Beendigung der Enzymreaktion einen Farbumschlag von blau nach gelb.⁹⁴

⁹² Vgl. IDEXX GmbH: „ELISA Technisches Handbuch“, 20011 S. 3,

⁹³ Vgl. IDEXX GmbH: Gebrauchsinformationen der einzelnen Assays, 2010

⁹⁴ Ebd.

1.2.2 IBRgB

Bei diesem Assay handelt es sich um einen kompetitiven ELISA.

Die Vertiefungen der MTP sind mit „BHV1-Antigen beschichtet, welches Antikörper aus der Probe [...], die gegen gB gerichtet sind“⁹⁵ nach einer definierten Inkubationszeit binden. Das Konjugat enthält monoklonale Enzym-gekoppelte Antikörper, die gleichfalls gegen das Antigen BHV-1-gB gerichtet sind. Diese Antikörper besetzen die noch freien Bindungsstellen. Sind alle Bindungsstellen durch Proben-AK belegt, wird sämtliches Konjugat beim Waschen entfernt. Die Substratlösung reagiert ausschließlich mit dem Enzym des Konjugats. Ist kein Konjugat gebunden erfolgt daher keine Farbreaktion. Dieser Test dient in Kombination mit dem Assay BHV-1 gE zur Unterscheidung zwischen gegen das BHV-1 Virus geimpften und natürlich erkrankten Tieren. Das natürliche Virus trägt sowohl das gB-als auch das gE-**Glykoprotein**. Dies bedeutet, dass natürlich infizierte Tiere sowohl Antikörper gegen das gB- als auch gegen das gE-Glykoprotein bilden. Der Impfstoff regt das Immunsystem nur zur Bildung von gegen das gB-Antigen gerichtetem Antikörper an. Wird eine Probe im Assay IBRgB als positiv, im Assay IBRgE aber als negativ bewertet, so gilt das Tier als geimpft, aber nicht erkrankt.⁹⁶

1.2.3 IBRgE

Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen kompetitiven ELISA.

Die Vertiefungen der MTP sind mit einem in einer bovinen Zelllinie gezüchteten BHV-1-gE-Antigen beschichtet. Alle gegen das BHV-1 Virus gerichteten Antikörper der Probe reagieren mit diesen Antigenen. Das Konjugat enthält Enzym-konjugierte, gegen das gE-Antigen des BHV-1 Virus gerichtete, monoklonale Antikörper, welche ebenfalls an die Plattenbeschichtung binden. Die Substratlösung reagiert nur mit dem an den monoklonalen AK gebundenen Enzym unter einer Farbentwicklung. Somit werden gE-Antikörper positive Proben farblos. Reagiert eine Probe in diesem Test positiv, spricht das für eine natürliche Exposition des Tieres mit dem BHV-1 Virus.⁹⁷

⁹⁵ Vgl. IDEXX GmbH: Gebrauchsanweisung der einzelnen Assays, 2010

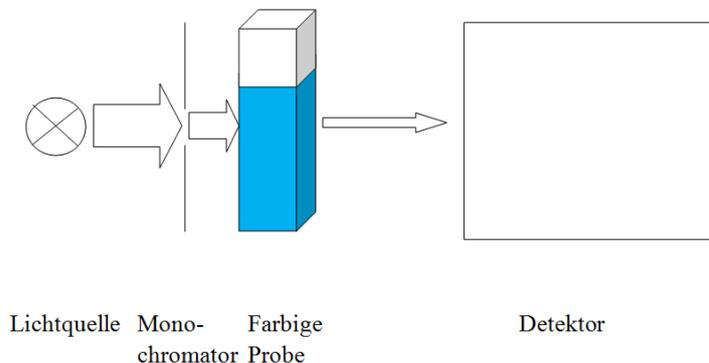
⁹⁶ Ebd.

⁹⁷ Ebd.

1.3 Funktionsprinzip Spektralphotometer

Das Spektralphotometer misst die optische Dichte einer Flüssigkeit. Dazu wird die Lichtintensität, die in eine Flüssigkeit eintritt mit der Lichtintensität, die aus der Flüssigkeit austritt, verglichen. Je nach Farbtintensität der Flüssigkeit absorbiert diese mehr oder weniger Licht. Das Maß für die Abschwächung des Lichts ist die Absorption oder auch optische Dichte.

Das Photometer erzeugt über einen Monochromator Licht einer Wellenlänge. Dieses



tritt in die farbige Flüssigkeit ein. Die farbige Flüssigkeit absorbiert einen Teil des Lichtes, so dass nur ein Teil des Lichts wieder aus der Flüssigkeit austritt. Dieses Licht wird in einem Detektor gemessen und der Wert der Absorption als Wert der optischen Dichte angegeben.⁹⁸

Abbildung 21: Funktionsschema Photometer.
Die Lichtquelle gibt Licht mit einem breiten Wellenlängenspektrum ab. Der Monochromator reduziert dieses Spektrum auf eine Wellenlänge. Beim Passieren der Probe wird ein Teil des Lichts absorbiert. Das transmittierte Licht wird mit einem Detektor gemessen.

2 Methoden

2.1 Washer

Die verwendeten Washer haben die Funktion des sog. Überstands - Waschen: Es wird mehr Waschlösung in die Kavität gegeben, als diese fassen kann. Erreicht der Flüssigkeitsstand einen gewissen Pegel, saugt die Aspirationsnadel die Flüssigkeit bis zu einem bestimmten Level ab. Dadurch wird ein Überlaufen der Kavitäten verhindert.⁹⁹ Aus diesem Grund werden 400µl statt der in den Gebrauchsanweisungen geforderten 300µl in die Kavitäten dispensiert.

⁹⁸ Vgl. Kunze, Schwedt: „Grundlagen der qualitativen Analyse“, 2009, S. 275

⁹⁹ Vgl. BioTek® Instruments, Inc.: www.biotek.de, 2011

2.2 Dispenser

2.2.1 Verdünnung der Farbstofflösung

Mittels eines Vorversuchs werden die Verdünnungen ermittelt, bei denen ungefähr ein OD -Wert von 0.5, 1.0, 1.5 und 2.0 erreicht wird. Anschließend werden diese Verdünnungen in zwei Reihen einer MTP gegeben (d.h. 12 Kavitäten pro Verdünnung) und bei 620nm mittels Tecan Sunrise Photometer gemessen.

2.2.2 Vorbereitung Analysenwaage

Zur Validierung wird die Analysenwaage der Firma Sartorius des Typs LE324S aus FB 32 ausgeliehen. Die Funktionstauglichkeit der Waage wird mittels Prüfgewichten festgestellt. Dazu werden dem vorgesehenen Wägebereich entsprechende Prüfgewichte verwendet:

Tabelle 16: Messdaten der Prüfung der Analysenwaage.

Prüfgewicht [g]	50	20	10	1	0,5	0,1	0,01	0,001
Messergebnisse [g]	50,0000	20,0000	10,0001	0,9999	0,5000	0,1000	0,0101	0,0010
	50,0000	20,0001	9,9999	0,9999	0,4999	0,1000	0,0099	0,0009
	50,0000	20,0001	9,9998	1,0000	0,4999	0,1001	0,0100	0,0011
	50,0001	19,9999	10,0001	1,0000	0,5001	0,1000	0,0101	0,0011
	49,9999	19,9999	10,0000	0,9999	0,5000	0,1000	0,0100	0,0009
	50,0000	20,0000	10,0000	1,0001	0,5001	0,0999	0,0099	0,0010
	50,0000	20,0000	9,9999	1,0000	0,5001	0,0999	0,0099	0,0009
	50,0001	20,0001	10,0001	1,0001	0,5000	0,1000	0,0101	0,0011
	50,0000	20,0000	10,0000	0,9999	0,4999	0,1001	0,0100	0,0010
	50,0000	20,0000	10,0001	1,0001	0,5000	0,1001	0,0101	0,0009
Mittelwert [g]	50,0000	20,0000	10,0000	1,0000	0,5000	0,1000	0,0100	0,0010
Standard- abweichung [g]	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

2.2.3 Dichtebestimmung

Für die genaue Justierung der Kämme ist eine Kenntnis der Dichte der einzelnen Reagenzien unabdingbar, da das pipettierte Volumen V von der Dichte ρ und der Masse m abhängig ist:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (12)$$

Nach Umformen ergibt sich:

$$V = \frac{m}{\rho} \quad (13)$$

Um die Dichte der verschiedenen Reagenzien zu bestimmen, wird jeweils das Gewicht von 1ml des zu bestimmenden Reagenzes ermittelt und die Dichte nach (6) berechnet. Es werden jeweils 10 Messungen durchgeführt.

Tabelle 17: Übersichtstabelle Dichte der Reagenzien¹⁰⁰

Dichte [g/ml]	Konjugat	Substrat	Stopplösung
BVD Ag	1,016	1,019	1,017
IBRgB	1,012	1,014	1,028
IBRgE	1,017	1,040	1,011

Diskussion¹⁰¹:

Die zufällige Messabweichung s ergibt sich aus den Mittelwert der Einzelvolumina \bar{V} und der Anzahl der Messungen n :

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}{n-1}} \quad (14)$$

Der Variationskoeffizient CV (Coefficient of variation) setzt sich aus der zufälligen Messabweichung s und dem Mittelwert der Messreihe zusammen und wird in Prozent angegeben:

$$CV = \left(\frac{s}{\bar{V}}\right) \cdot 100 \quad (15)$$

Tabelle 18: Diskussion der Dichtebestimmung.

Die zufälligen Messabweichungen zeigen eine sehr geringe Streuung und der Variationskoeffizient beträgt jeweils <1%. Die Messungen sind daher sehr präzise und der Mittelwert nahe dem wahren Wert der jeweiligen Dichte.

	Dichte [g/ml]	zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
BVD Ag			
Konjugat	1,016	0,01	0,60%
Substrat	1,019	0,00	0,35%
Stopplösung	0,006	0,00	0,35%
IBRgB			
Konjugat	1,012	0,00	0,42%
Substrat	1,014	0,00	0,26%
Stopplösung	1,028	0,00	0,35%
IBRgE			
Konjugat	1,017	0,01	0,60%
Substrat	1,040	0,01	0,91%
Stopplösung	1,011	0,00	0,24%

¹⁰⁰ Die Werte der einzelnen Messung sind in Anhang B, Tabelle 62, S. B-25 dargestellt.

¹⁰¹ Grundlagen der Berechnung aus Deutsches Institut für Normung e.V., „DIN EN ISO 8655“, 2002, Teil 6, S. 14

Die Werte für den Variationskoeffizient liegen für sämtliche Reagenzien unterhalb von 1%. Dies bedeutet, dass die Dichte der Reagenzien mit einer Wahrscheinlichkeit über 99% korrekt bestimmt worden sind.

2.2.3 Zusammenhang OD/Volumen - Versuchsdurchführung

Die Farbstofflösung wurde in der Verdünnung 1:1000 mit den Volumen 90µl, 100µl und 110µl verwendet. Jedes Volumen wird mit einer geeigneten kalibrierten Pipette in jeweils zwei Spalten einer unbeschichteten MTP dispensiert und bei einer Wellenlänge von 620nm mittels Tecan Sunrise Photometer gemessen.

Tabelle 19: Messergebnisse der 1:1000 verdünnten Farbstofflösung.
 Jedes Volumen wurde 12mal pipettiert. Aus den Einzelmessergebnissen jedes Volumen wurden die Werte gemittelt und für die Korrelationskurve verwendet (s. Abbildung 8, S. 16).

	90µl		100µl		110µl	
Nadel	1	2	3	4	5	6
A	0,585	0,594	0,624	0,629	0,655	0,666
B	0,589	0,595	0,628	0,629	0,657	0,656
C	0,586	0,594	0,621	0,623	0,658	0,658
D	0,590	0,594	0,630	0,627	0,661	0,668
E	0,592	0,592	0,629	0,622	0,662	0,662
F	0,585	0,596	0,627	0,633	0,662	0,665
G	0,588	0,592	0,628	0,616	0,657	0,654
H	0,590	0,601	0,634	0,631	0,651	0,655
Mittelwert	(0,591±0,00)		(0,627±0,00)		(0,659±0,00)	

B. Anhang B – Screenshots und Ergebnistabellen

1 Assays

1.1 Editionen

1.1.1 BVD Ag

A. WARE - Lab Automation Control (Logged User: Admin)

Main System Error Handling About

Application

- Customer
- CreateJobs
- EditAssay
- PlateSearch
- PosState

Application

Orders

EDIT ASSAY

Edit Assay

BVDV

Assay Owner: Admin Version Number: 16

Assay Name: BVDV

Identifier: 70 Canal: 2

Incubation 1 Temp. [°C]: 37°C [35°C ... 39°C] Time [hh/mm]: 02:00

WasherStep 1 Program: BVD_AG_ID

Konjugat Volume [µl]: 100

Incubation 2 Temp. [°C]: 22°C [20°C ... 24°C] Time [hh/mm]: 00:30

WasherStep 2 Program: BVD_AG_ID

Substrat Volume [µl]: 100

Incubation 3 Temp. [°C]: 22°C [20°C ... 24°C] Time [hh/mm]: 00:10

Stop Volume [µl]: 100

Reader Program: BVD_AG_ID_EIA

Update

Abbildung 22: Screenshot Edition BVD Ag.

1.1.2 IBRgB

A. WARE - Lab Automation Control (Logged User: Admin)

Main System Error Handling About

Application

- Customer
- CreateJobs
- EditAssay
- PlateSearch
- PosState

Application

Orders

EDIT ASSAY

Edit Assay

IBRgB

Assay Owner: Admin Version Number: 29

Assay Name: IBRgB

Identifier: 12 Canal: 3

Incubation 1 Temp. [°C]: 37°C [35°C ... 39°C] Time [hh/mm]: 02:00

WasherStep 1 Program: IBR_GB_ID

Konjugat Volume [µl]: 100

Incubation 2 Temp. [°C]: 22°C [20°C ... 24°C] Time [hh/mm]: 00:30

WasherStep 2 Program: IBR_GB_ID

Substrat Volume [µl]: 100

Incubation 3 Temp. [°C]: 22°C [20°C ... 24°C] Time [hh/mm]: 00:10

Stop Volume [µl]: 100

Reader Program: IB_GB_ID_EIA

Update

Abbildung 23: Screenshot Edition IBRgB.

1.1.3 IBRgE

The screenshot displays the 'A.WARE - Lab Automation Control' software interface. At the top, it shows the user is logged in as 'Admin'. The main navigation bar includes 'Main System', 'Error Handling', and 'About'. A left sidebar lists application modules: 'Customer', 'CreateJobs', 'EditAssay', 'PlateSearch', and 'PosState'. The 'Application' and 'Orders' sections are also visible at the bottom of the sidebar.

The central 'EDIT ASSAY' window is titled 'IBRgE'. It contains the following fields and settings:

- Assay Owner: Admin
- Version Number: 27
- Assay Name: IBRgE
- Identifier: 14
- Canal: 1
- Incubation 1 Temp. [°C]: 22°C [20°C ... 24°C]
- Time [hh/mm]: 18:00
- WasherStep 1 Program: IBR_GE_ID
- Konjugat Volume [µl]: 100
- Incubation 2 Temp. [°C]: 22°C [20°C ... 24°C]
- Time [hh/mm]: 00:30
- WasherStep 2 Program: IBR_GE_ID
- Substrat Volume [µl]: 100
- Incubation 3 Temp. [°C]: 22°C [20°C ... 24°C]
- Time [hh/mm]: 00:15
- Stop Volume [µl]: 100
- Reader Program: IB_GE_ID_EIA

Large green arrows point downwards between the incubation and washer step sections. An 'Update' button is located at the bottom of the form.

Abbildung 24: Screenshots Edition IBRgE.

2 Washer

2.1 Zuordnung Waschlösung

Tabelle 20: Ergebnistabelle Zuordnung Waschlösung Assay BVD Ag.

Für den Assay wurde in einem Versuch mit 10 Testplatten stets die korrekte Waschlösung verwendet.

Testplatte	Washer Nr.		Waschlösung	
	1. Waschschrift	2. Waschschrift	1. Waschschrift	2. Waschschrift
707052	1	1	OK	OK
707053	1	1	OK	OK
707066	1	1	OK	OK
707067	1	1	OK	OK
707068	1	1	OK	OK
707069	1	1	OK	OK
707070	2	1	OK	OK
707071	2	1	OK	OK
707072	2	1	OK	OK
707073	2	1	OK	OK

Tabelle 21: Ergebnistabelle Zuordnung Waschlösung Assay IBRgB.

Für den Assay wurde in einem Versuch mit 10 Testplatten stets die korrekte Waschlösung verwendet.

Testplatte	Washer Nr.		Waschlösung	
	1. Waschschrift	2. Waschschrift	1. Waschschrift	2. Waschschrift
124713	3	1	OK	OK
124719	3	1	OK	OK
125626	3	3	OK	OK
125628	3	3	OK	OK
125629	3	3	OK	OK
125630	3	3	OK	OK
125645	3	3	OK	OK
125653	1	3	OK	OK
125663	1	1	OK	OK
125664	1	1	OK	OK

Tabelle 22: Ergebnistabelle Zuordnung Waschlösung IBRgE.

Für den Assay wurde in einem Versuch mit 10 Testplatten stets die korrekte Waschlösung verwendet.

Testplatte	Washer		Waschlösung	
	1. Waschschrift	2. Waschschrift	1. Waschschrift	2. Waschschrift
147752	1	2	OK	OK
147754	1	2	OK	OK
147755	1	2	OK	OK
147756	1	2	OK	OK
147757	1	2	OK	OK
147758	1	2	OK	OK
147759	1	2	OK	OK
147760	1	2	OK	OK
147761	1	2	OK	OK
147802	1	2	OK	OK

Tabelle 23: Ergebnistabelle Zuordnung Waschlösung Multi Assay Testlauf.
 Bei paralleler Abarbeitung mehrerer Assays wird jeweils die korrekte Waschlösung verwendet.

Testplatte	Washer		Waschlösung	
	1. Waschschritt	2. Waschschritt	1. Waschschrift	2. Waschschrift
147758	1	2	OK	OK
147759	1	2	OK	OK
147760	1	2	OK	OK
147761	1	2	OK	OK
147802	1	2	OK	OK
125630	3	3	OK	OK
125645	3	3	OK	OK
125650	3	3	OK	OK
125653	3	3	OK	OK
125663	3	3	OK	OK
707067	1	1	OK	OK
707068	1	1	OK	OK
707069	1	1	OK	OK
707071	1	1	OK	OK
707072	1	1	OK	OK

2.2 Überprüfung Waschprogramm

2.2.1 BVD Ag

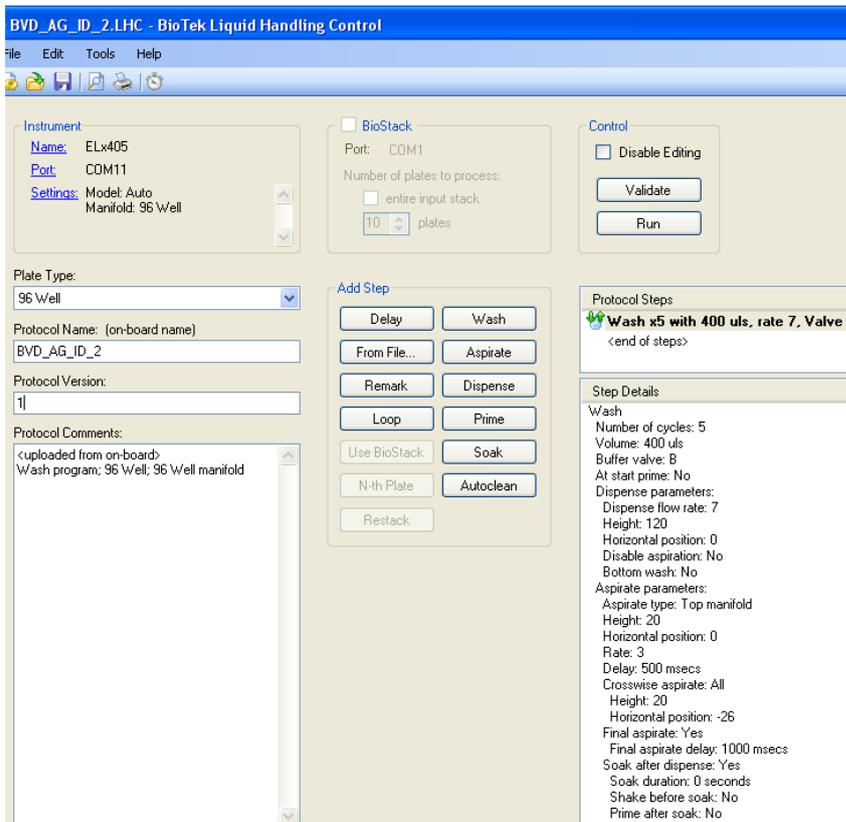


Abbildung 25: Screenshot Waschprogramm BVD Ag von Washer 1 (Port: COM11).
 Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Für BVD Ag verwenden alle drei Washer Kanal 2. Unter Protocol Steps ist Kanal 2 mit Valve B tituliert.

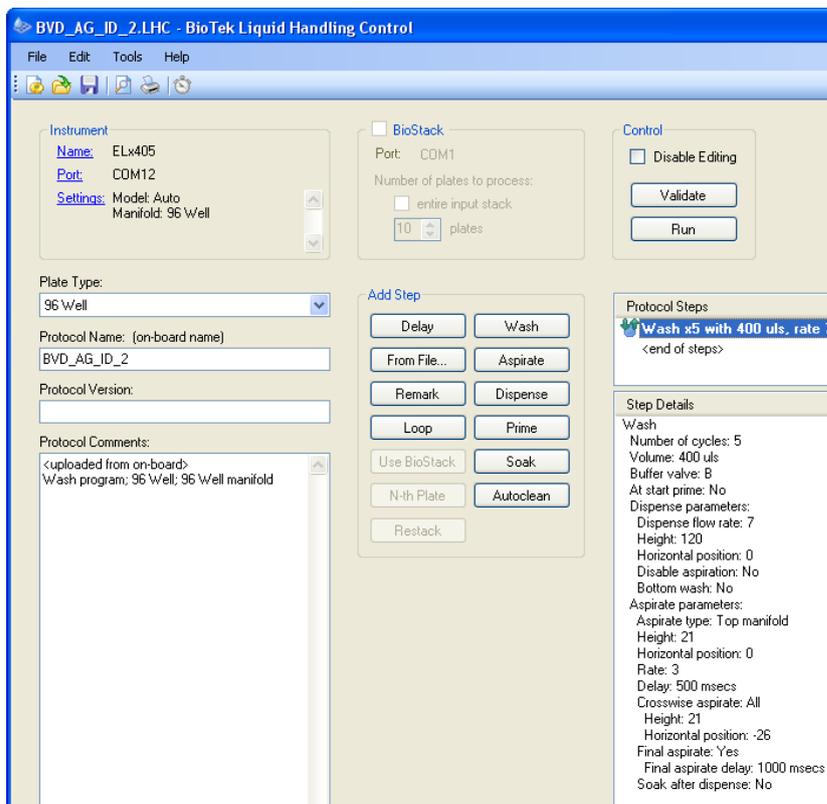


Abbildung 26: Screenshot Waschprogramm BVD Ag von Washer 2 (Port: COM12).
 Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Für BVD Ag verwenden alle drei Washer Kanal 2. Unter Protocol Steps ist Kanal 2 mit Valve B titliert.

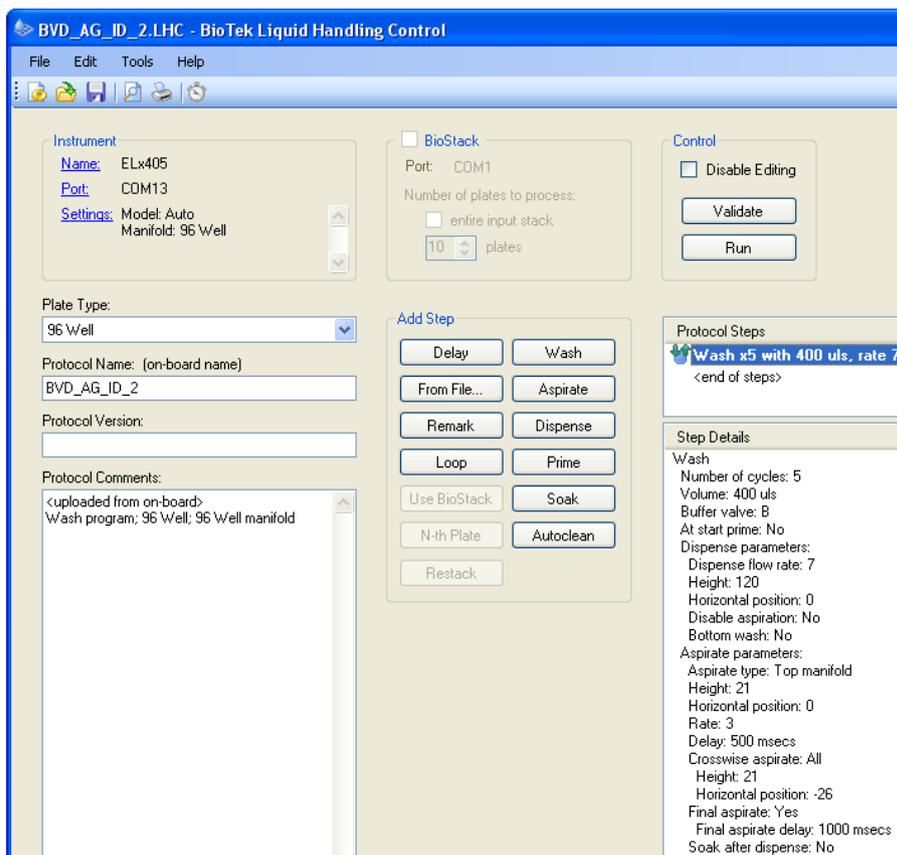


Abbildung 27: Screenshot Waschprogramm BVD Ag von Washer 3 (Port: COM13).
 Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Für BVD Ag verwenden alle drei Washer Kanal 2. Unter Protocol Steps ist Kanal 2 mit Valve B titliert.

Tabelle 24: Ergebnistabelle Überprüfung Anzahl Waschzyklen BVD Ag.

Bei diesem Assay wird in einem Versuch mit 10 MTP stets die korrekte Anzahl Waschzyklen durchgeführt.

Testplatte	1. Waschschrift		2. Waschschrift	
	Washer	Anzahl Waschzyklen	Washer	Anzahl Waschzyklen
708653	1	5	2	5
708648	1	5	2	5
707067	1	5	2	5
707073	1	5	2	5
707072	1	5	2	5
707053	1	5	2	5
707068	1	5	2	5
707070	1	5	2	5
708646	1	5	2	5
707066	1	5	2	5

2.2.2 IBRgB

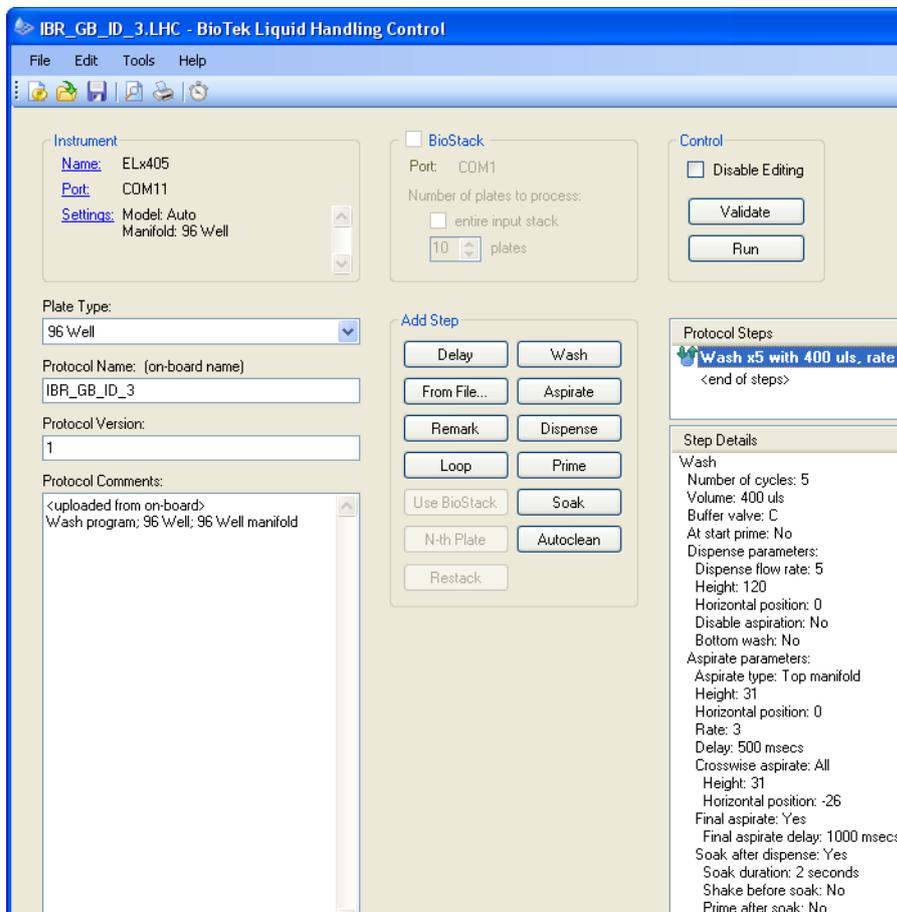


Abbildung 28: Screenshot Waschprogramm IBRgB.

Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Für IBRgB verwenden alle drei Washer Kanal 3. Unter Protocol Steps ist Kanal 3 mit Valve C titliert.

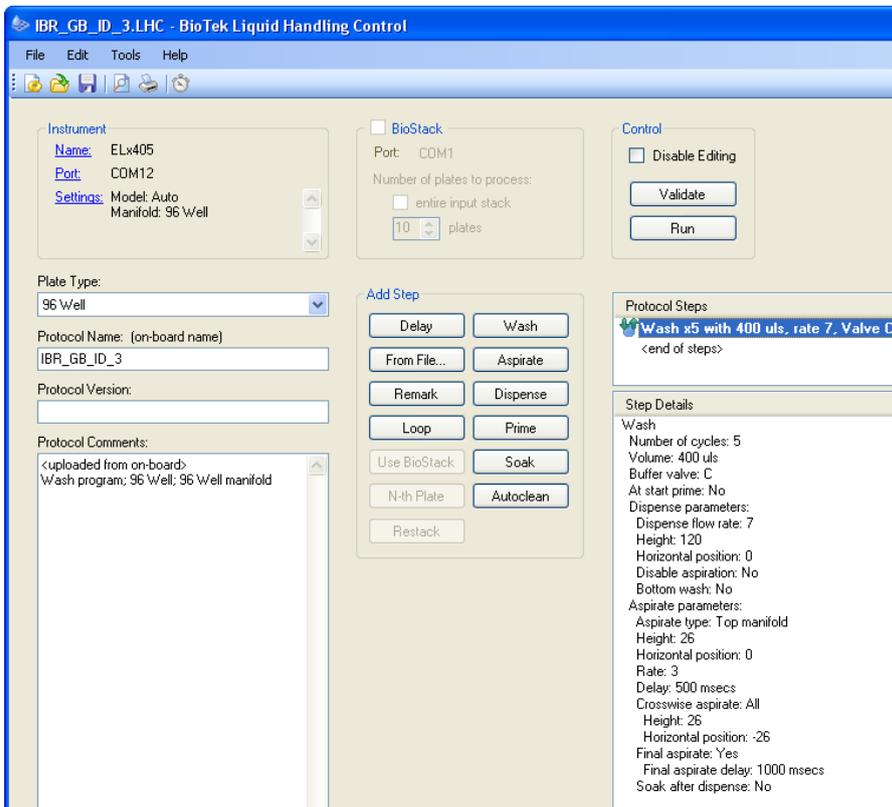


Abbildung 29: Screenshot Waschprogramm IBRgB von Washer 2.
Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Für IBRgB verwenden alle drei Washer Kanal 3. Unter Protocol Steps ist Kanal 3 mit Valve C tituliert.

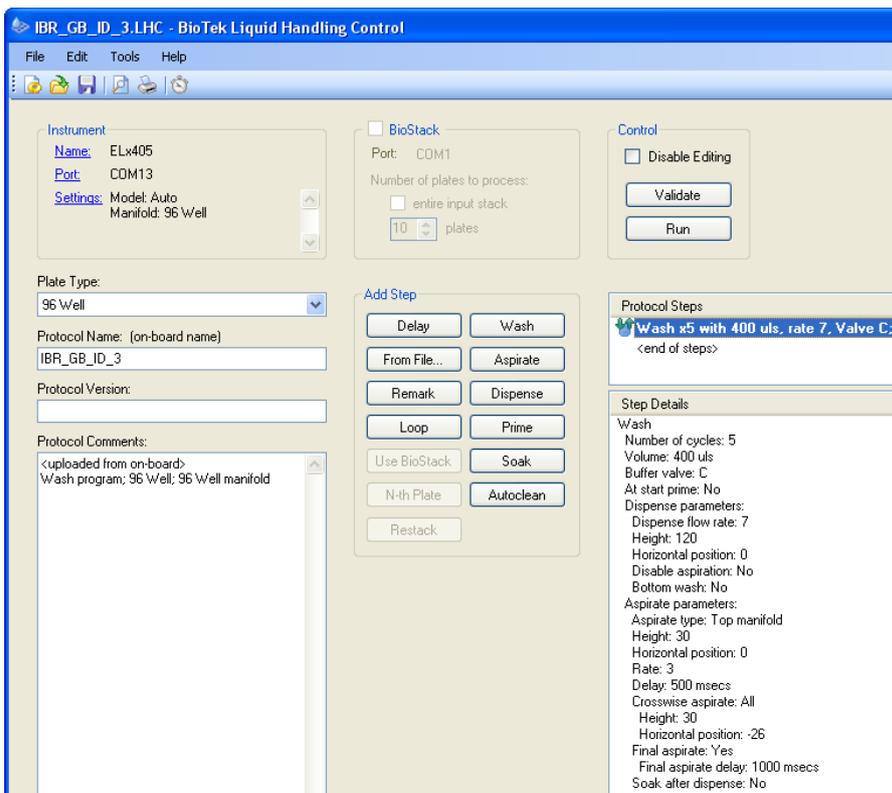


Abbildung 30: Screenshot Waschprogramm IBRgB von Washer 3.
Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Für IBRgB verwenden alle drei Washer Kanal 3. Unter Protocol Steps ist Kanal 3 mit Valve C tituliert.

Tabelle 25: Ergebnistabelle Überprüfung Anzahl Waschzyklen IBRgB.

Für diesen Assay wird in einem Versuch mit 10 MTP stets die korrekte Anzahl Waschzyklen durchgeführt.

Testplatte	1. Waschschrift		2. Waschschrift	
	Washer	Anzahl Waschzyklen	Washer	Anzahl Waschzyklen
125628	3	5	1	5
125653	3	5	1	5
125626	3	5	1	5
125650	3	5	1	5
124719	3	5	1	5
125629	3	5	1	5
125651	3	5	1	5
125645	3	5	1	5
124713	3	5	1	5
125652	3	5	1	5

2.2.3 IBRgE

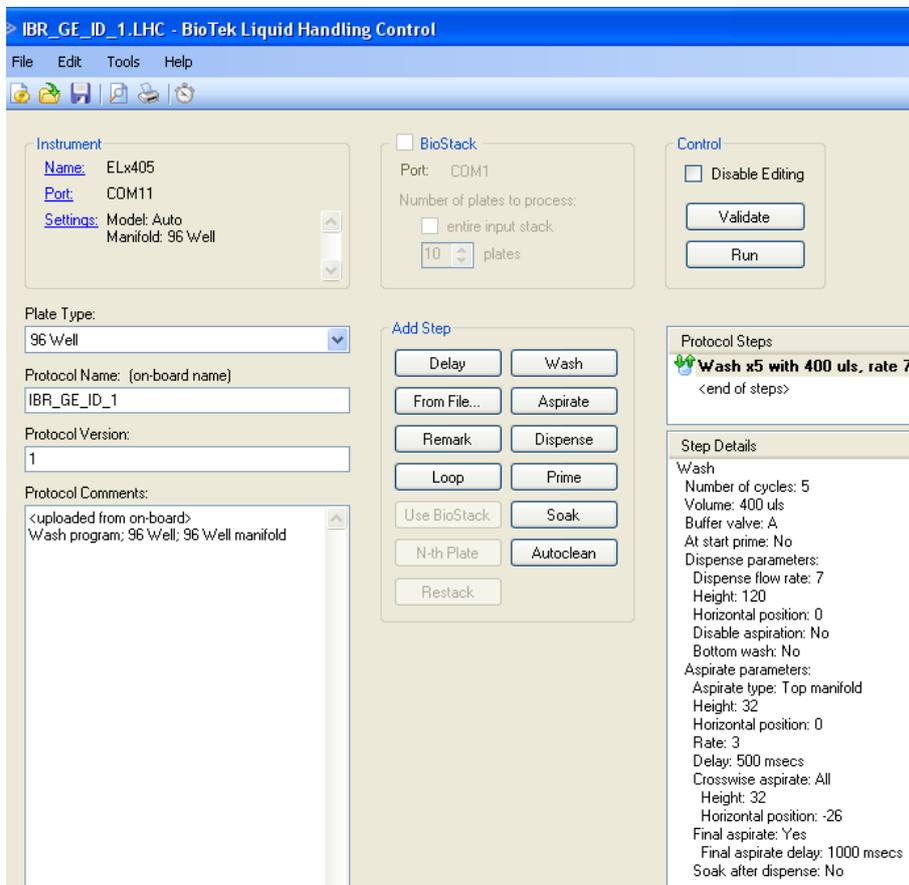


Abbildung 31: Screenshot Waschprogramm IBRgE von Washer 1.

Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Für IBRgE verwenden alle drei Washer Kanal 1. Unter Protocol Steps ist Kanal 1 mit Valve A titliert.

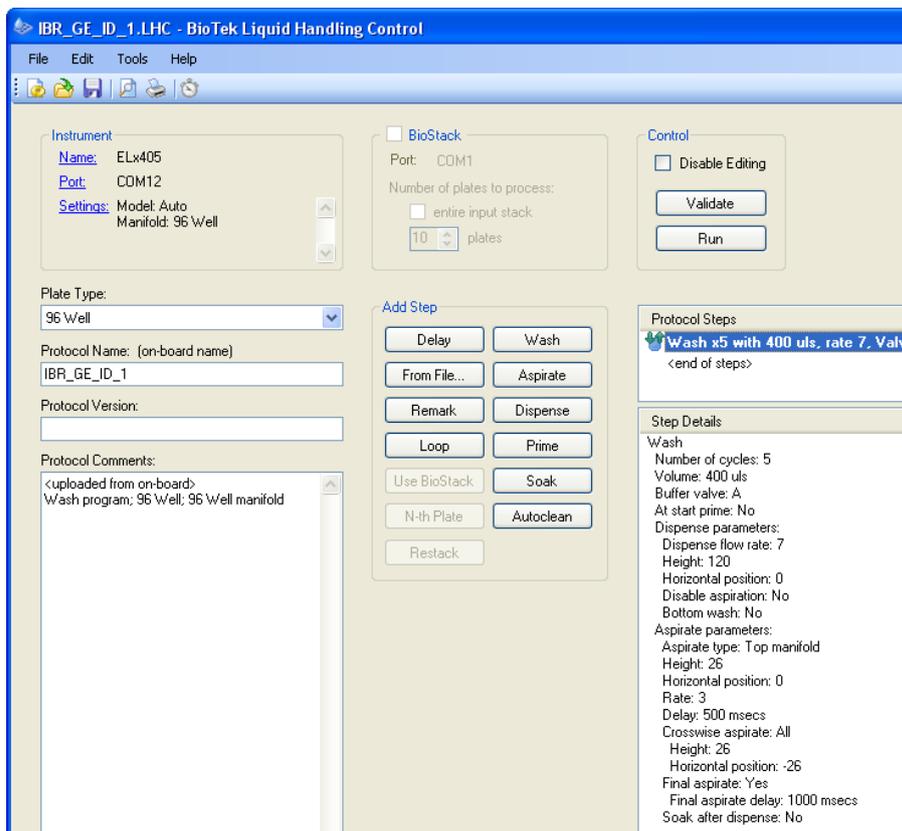


Abbildung 32: Screenshot Waschprogramm IBRgE von Washer 2.
 Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Für IBRgE verwenden alle drei Washer Kanal 1. Unter Protocol Steps ist Kanal 1 mit Valve A titliert.

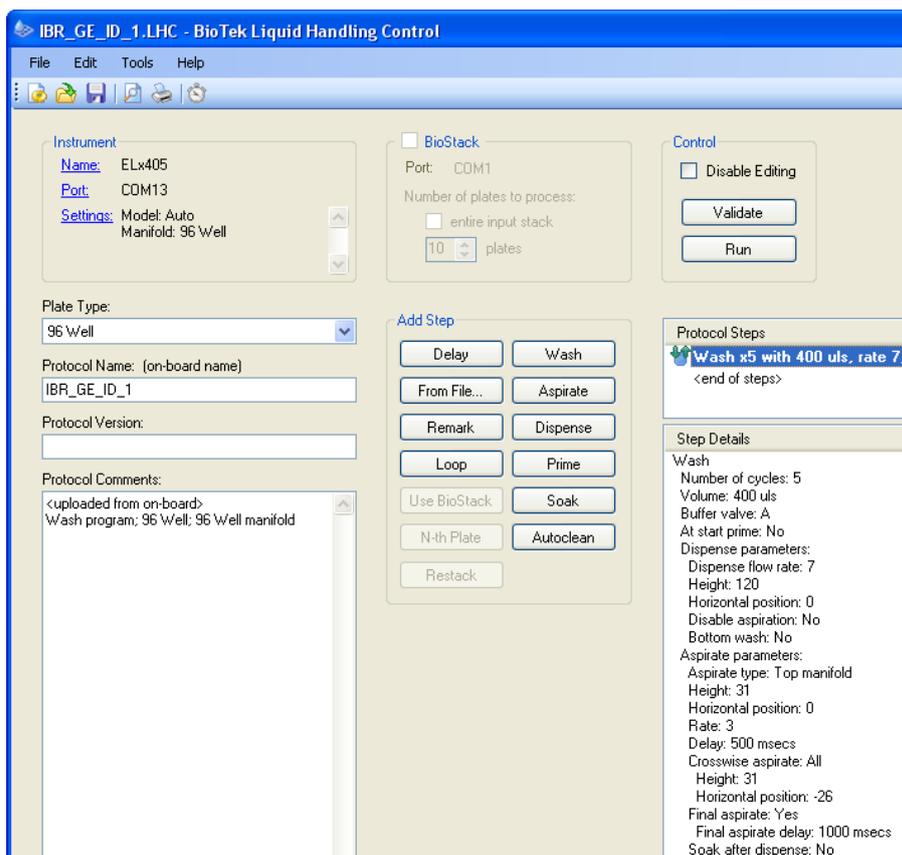


Abbildung 33: Screenshot Waschprogramm IBRgE von Washer 3.
 Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Für IBRgE verwenden alle drei Washer Kanal 1. Unter Protocol Steps ist Kanal 1 mit Valve A titliert.

Tabelle 26: Ergebnistabelle Überprüfung Anzahl Waschzyklen IBRgE.

Bei diesem Assay wird in einem Versuch mit 10 MTP stets die korrekte Anzahl Waschzyklen durchgeführt.

Testplatte	1. Waschschrift		2. Waschschrift	
	Washer	Anzahl Waschzyklen	Washer	Anzahl Waschzyklen
147753	1	5	1	5
147762	1	5	1	5
147757	2	5	1	5
147758	2	5	1	5
147759	2	5	1	5
147802	2	5	1	5
147760	2	5	1	5
147761	2	5	1	5
147755	2	5	1	5
147756	2	5	1	5

2.2.4 Gesamt

Tabelle 27: Ergebnistabelle Überprüfung Anzahl Waschzyklen im Multi Assay Test.

Es wurde stets die korrekte Anzahl durchgeführt.

Testplatte	1. Waschschrift		2. Waschschrift	
	Washer	Anzahl Waschzyklen	Washer	Anzahl Waschzyklen
147753	1	5	1	5
708648	1	5	2	5
125653	3	5	1	5
147758	2	5	1	5
707072	1	5	2	5
125650	3	5	1	5
147760	2	5	1	5
707070	1	5	2	5
125629	3	5	1	5
147756	2	5	1	5
707066	1	5	2	5
125645	3	5	1	5
147755	2	5	1	5
707053	1	5	2	5
125628	3	5	1	5

2.2.5 Übersicht Einstellungen Washer

Tabelle 28: Übersichtstabelle Einstellungen der Waschprogramme.

Mittels dieser Einstellung wird eine optimale Dauer der einzelnen Waschzyklen erreicht. Ferner wird die Waschlösung fast vollständig am Ende eines Waschprogramms entfernt.

	Washer 1			Washer 2			Washer 3		
	BVD Ag	IBRgB	IBRgE	BVD Ag	IBRgB	IBRgE	BVD Ag	IBRgB	IBRgE
Wash Step Parameters									
Dispense Volume (per well) [µl]	400	400	400	400	400	400	400	400	400
Number of Cycles	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Buffer Valve	B	C	A	B	C	A	B	C	A
Dispense Parameters									
Dispense Flow Rate	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Dispense Height	120	120	120	120	120	120	120	120	120
Horizontal Position	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Aspirate Parameters									
Aspirate Height	20	31	32	21	26	26	21	30	31
Horizontal Position	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Aspirate Rate	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Aspirate Delay [ms]	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Crosswise Aspirate Option	All	All	All	All	All	All	All	All	All
Crosswise Aspir Height	20	31	32	21	26	26	21	30	31
Crosswise Horiz Pos	-26	-26	-26	-26	-26	-26	-26	-26	-26
Final Aspirate	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES
Final Aspirate Delay [ms]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

2.2.6 Kontrolle Waschergebnis

Tabelle 29: Ergebnistabelle Wascherfolg.

Die Waschprogramme werden für jeden Assay einzeln ausgeführt. Nach dem Waschvorgang wird die Testplatte auf saugfähigen Tüchern ausgeklopft. Ein verwertbares Ergebnis ist erreicht, wenn kaum Reste der Waschlösung auf den Tüchern sichtbar werden.

	Washer 1			Washer 2			Washer 3		
	BVD Ag	IBRg B	IBRgE	BVD Ag	IBRg B	IBRgE	BVD Ag	IBRg B	IBRgE
1	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
2	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
3	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
4	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
5	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
6	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
7	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
8	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
9	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
10	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

2.3 Befüll- und Absaugkontrolle

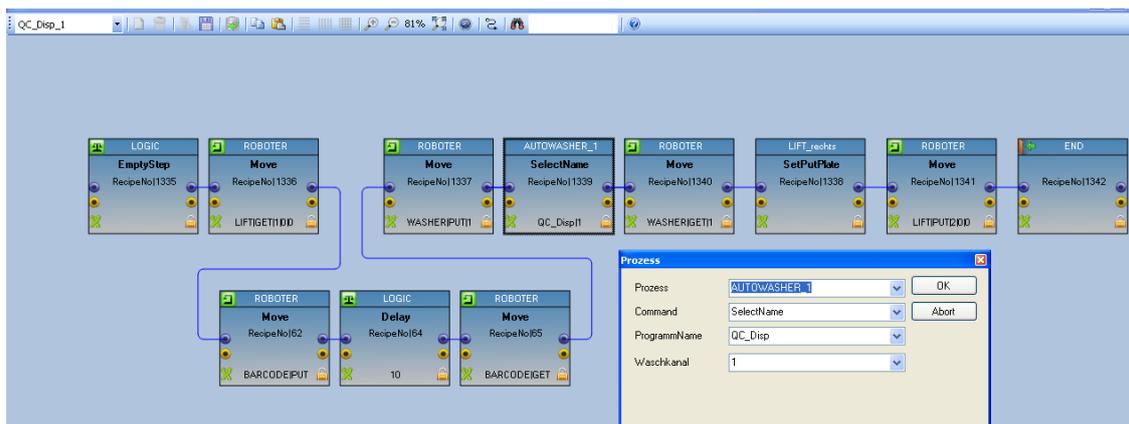


Abbildung 34: Screenshot Rezept Befüllkontrolle.

Gezeigt ist das Rezept für Washer 1. Die Abarbeitung erfolgt von links nach rechts:

Logic: Jedes Rezept muss laut Fa. Peters mit einem ‚EmptyStep‘ begonnen werden.

ROBOTER|MOVE|LIFT/GET/1/0/0: Der Roboterarm holt sich eine Testplatte aus dem Eingangsmodul.

ROBOTER|MOVE|BARCODE|PUT: Der Roboterarm legt die Testplatte auf der Barcode – Lesestation ab.

LOGIC|DELAY: Pausenschritt.

ROBOTER|MOVE|BARCODE/GET: Der Roboterarm nimmt die Testplatte von der Barcode – Leseposition ab.

ROBOTER|MOVE|WASHER/PUT/1: Der Roboterarm bringt die Testplatte zu Washer ein.

AUTOWASHER_1|QC_Disp/1: Washer 1 führt das Waschprogramm QC_Disp der LHC – Software aus und verwendet dabei Kanal 1.

ROBOTER|MOVE|WASHER/GET/1: Der Roboterarm nimmt die Testplatte aus Washer 1 auf.

LIFT_rechts|SetPutPlate: Der Ausgangsliift wird in die Position zur Aufnahme von Testplatten gebracht.

ROBOTER|MOVE|LIFT/PUT/2/0/0: Der Roboterarm legt die Testplatte im Ausgangsliift ab.

END: Mit diesem Befehl muss laut Fa. Peters jedes Rezept enden.

Die Rezepte für Washer 2 und Washer 3 sind analog hierzu.

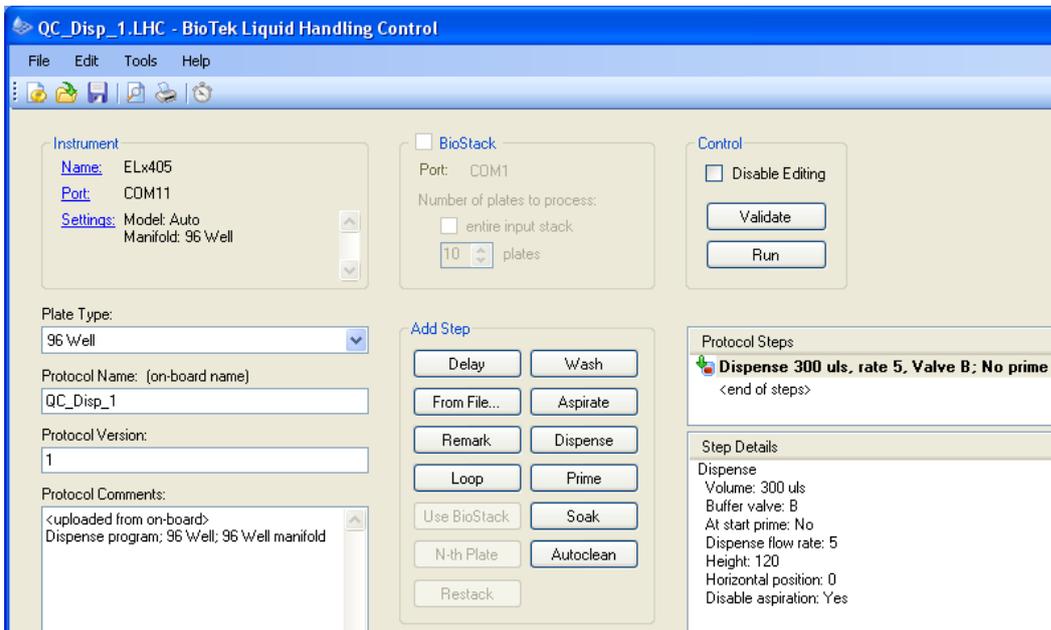


Abbildung 35: Screenshot Waschprogramm Befüllkontrolle.

Die Waschprogramme von Washer 1 und Washer 3 sind analog. Die Zahl im Protocol Name zeigt den verwendeten Kanal. Alle drei Washer verwenden derzeit Kanal 2. Unter Protocol Steps ist Kanal 1 mit Valve A titulierte.

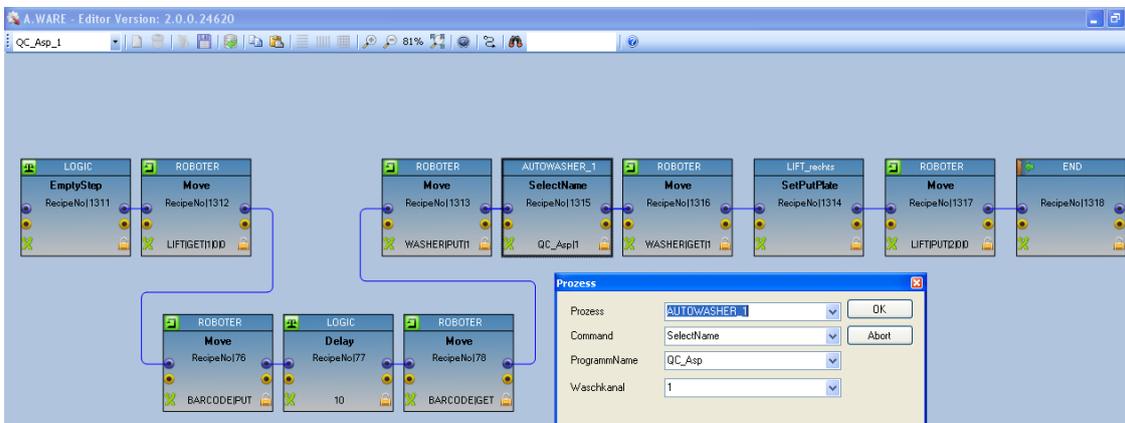


Abbildung 36: Screenshot Rezept Absaugkontrolle.

Gezeigt ist das Rezept für Washer 1. Die Schritte sind mit denen in Abbildung 34 in der Funktionsweise identisch. Einziger Unterschied: Washer 1 führt das Waschprogramm QC_Asp aus und verwendet dabei Kanal 1. Die Rezepte für Washer 2 und Washer 3 sind ebenfalls analog hierzu.

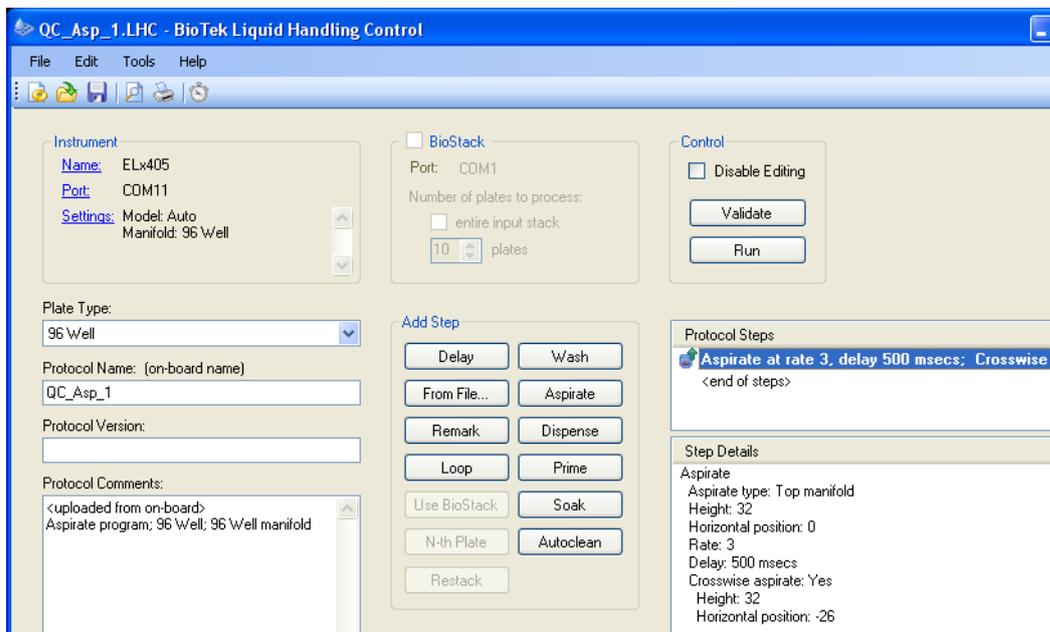


Abbildung 37: Screenshot Waschprogramm Absaugkontrolle.
Gezeigt ist das Waschprogramm von Washer 2 (COM Port 11). Die Waschprogramme von Washer 1 und Washer 3 sind analog.

Tabelle 30: Ergebnisübersicht der Validierung der Washer.

Für jeden Assay werden sowohl die richtige Waschlösung als auch das korrekte Waschprogramm verwendet. Ebenso werden die Kavitäten vollständig mit Waschlösung befüllt. Die Waschlösung wird im zweiten Schritt vollständig entfernt.

	BVD Ag	IBRgE	IBRgB
Zuordnung			
solo	OK	OK	OK
mix	OK	OK	OK
Waschprogramme			
solo	OK	OK	OK
mix	OK	OK	OK
Befüllkontrolle	OK	OK	OK
Absaugkontrolle	OK	OK	OK

2.4 Soak Prozedur nach definierter Standzeit

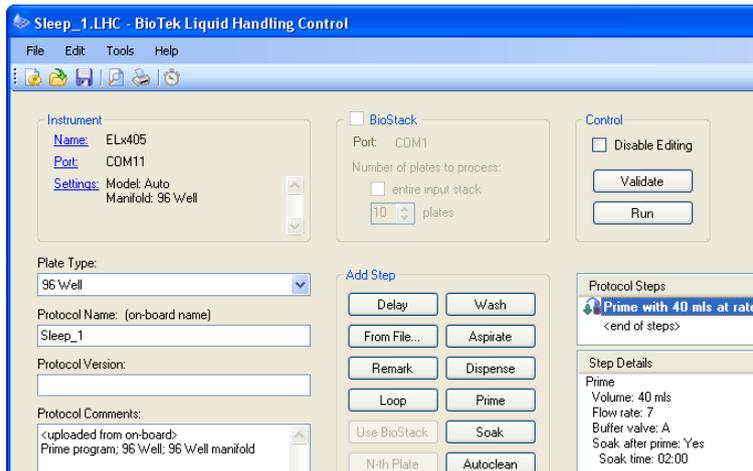


Abbildung 38: Screenshot Waschprogramm Sleep.

Gezeigt ist das Programm für Washer 1 (Port: COM11) mit Kanal 1 (Valve A). Die Programme für die Kanäle 2 und 3 sowie Washer 2 und 3 sind analog. Das System wird jeweils mit 40ml der zuletzt verwendeten Waschlösung gespült, das Reservoir gefüllt und der Waschkopf in dieses für 2h abgesenkt. Sowohl die Ansteuerung des zuletzt verwendeten Kanals als auch der Abbruch bei Gebrauch wird über A.WARE gesteuert.

2.5 Tägliche Reinigung

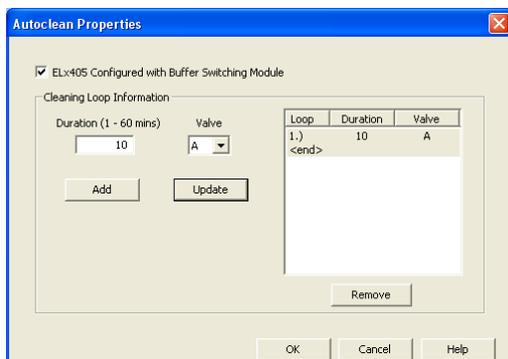


Abbildung 39: Screenshot Steuerungsfenster Ultraschallbad.

Durch Auswahl des Loops im rechten Teil kann im linken Bereich die Zeitdauer (Duration) und der zu verwendende Kanal (Valve) für jeden Washer individuell eingestellt werden.

2.6 Wöchentliche Reinigung

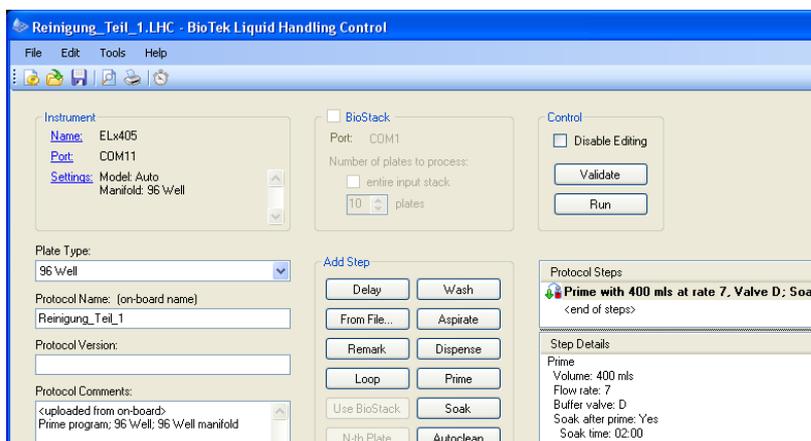


Abbildung 40: Screenshot Waschprogramm Reinigung, 1. Teil.

Gezeigt ist das Waschprogramm von Washer 1 (Port: COM11). Die Programme von Washer 2 (Port: COM12) und Washer 3 (Port: COM13) sind analog. Kanal 4 wird unter 'Protocol Steps' als Valve D bezeichnet. Nach einem Spülen des Systems mit 400ml Reinigungsdetergenz wird das Reservoir gefüllt. In dieses taucht der Waschkopf für 2h ein.

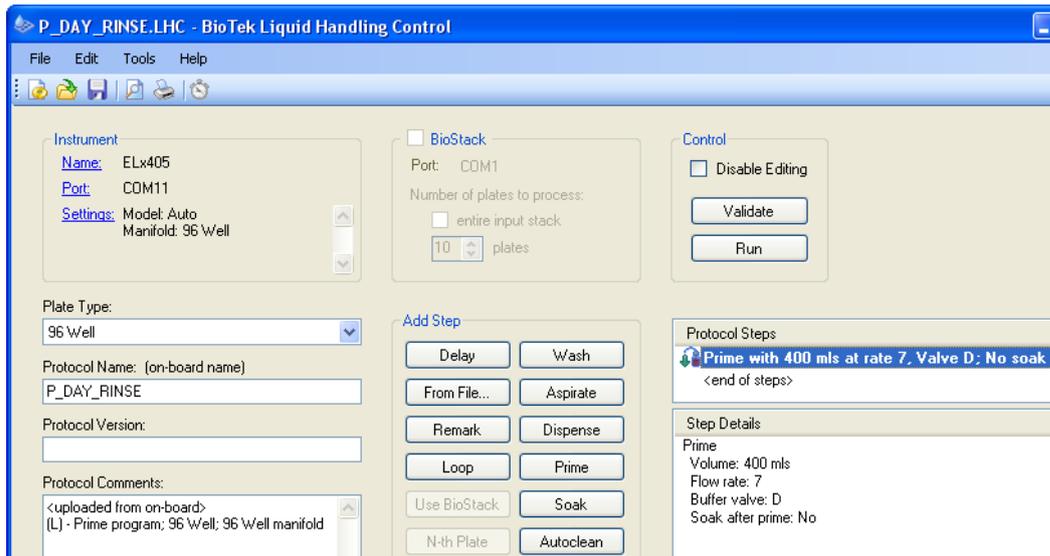


Abbildung 41: Screenshot Waschprogramm P_Day_Rinse.

Am Anschluss an den ersten Teil der Reinigung wird Kanal 4 an a.d.em angeschlossen und das System fünfmal gespült. Gezeigt ist hier das Programm für Washer 1. Die Programme für Washer 2 und 3 sind analog.

3 Dispenser

Tabelle 31: Überschussberechnung Reagenzien.

In der Tabelle ist gezeigt, welches Volumen von jedem Reagenz mindestens für die Anzahl der Testplatten benötigt wird. Nicht berücksichtigt ist der erhöhte Verbrauch von Kontrollen und Waschlösungen bei sog. Anbruchplatten, d.h. MTP, bei denen nicht alle Kavitäten Proben enthalten.

(BHV 1) gE	vorhandene Menge	benötigte Menge[ml]	Überschuss [ml]	Überschuss [%]	zusätzliche Kolben
Anzahl Testplatten	30				
Konjugat [ml]	350	288	62	17,7	
Substrat [ml]	315	288	27	8,6	
Stopplösung [ml]	315	288	27	8,6	
Probenverdünner [ml]	480	144	336	70,0	
Waschkonzentrat [ml]	1440	864	576	40,0	5L
positive Kontrolle [ml]	6,5	3	3,5	53,8	
negative Kontrolle [ml]	6,5	3	3,5	53,8	
IBRgB					
Anzahl Testplatten	30				
Konjugat [ml]	350	288	62	17,7	
Substrat [ml]	315	288	27	8,6	
Stopplösung [ml]	315	288	27	8,6	
Waschkonzentrat [ml]	1440	864	576	40,0	5L
positive Kontrolle [ml]	6,5	3	3,5	53,8	
negative Kontrolle [ml]	6,5	3	3,5	53,8	
BVD AG					
Anzahl Testplatten	5				
Konjugat [ml]	60	48	12	20,0	
Substrat [ml]	60	48	12	20,0	
Stopplösung [ml]	60	48	12	20,0	
Detektionsantikörper [ml]	60	24	36	60,0	
Waschkonzentrat [ml]	480	144	336	70,0	2L
positive Kontrolle [ml]	2	0,2	1,8	90,0	
negative Kontrolle [ml]	2	0,2	1,8	90,0	
Ohrstanzpuffer	160	120	40	25,0	

Tabelle 32: Ergebnisse Silikonschlauchtest.

In den Konjugaten sind nach 7 Tagen leichte Ausflockungen sichtbar. Hierbei handelt es sich um Aggregationen der enthaltenen Antikörper. Die Substrate verursachen eine leichte, nicht entfernbare Vergilbung der Schläuche.

Reagenz/ Zeit [Tagen]	1	2	5	7
BVD Ag Konjugat	Ok	Ok	Ok	leichte Ausflockungen
Substrat	-----Gelbliche Verfärbung-----			
Stopp	Ok	Ok	Ok	Ok
IBRgB Konjugat	Ok	Ok	Ok	leichte Ausflockungen
Substrat	-----Gelbliche Verfärbung-----			
Stopp	Ok	Ok	Ok	Ok
IBRgE Konjugat	Ok	Ok	Ok	leichte Ausflockungen
Substrat	-----Gelbliche Verfärbung-----			
Stopp	Ok	Ok	Ok	Ok
Farblösung	Ok	Ok	Ok	Ok

3.1 Verdünnung der Farblösung

Tabelle 33: Messwerte der Verdünnungen der Farblösung.
Mit steigender Verdünnung sinkt der gemessene OD – Wert und der Fehler.

Verdünnung	1:1000	1:700	1:460	1:340
1	0,616	1,047	1,533	2,095
2	0,619	1,065	1,553	2,132
3	0,615	1,060	1,549	2,100
4	0,614	1,057	1,548	2,121
5	0,621	1,058	1,538	2,132
6	0,620	1,061	1,545	2,121
7	0,619	1,057	1,524	2,137
8	0,616	1,042	1,554	2,129
9	0,617	1,034	1,505	2,059
10	0,626	1,055	1,522	2,087
Mittelwert	0,618	1,054	1,537	2,111
Abweichung	0,00	0,01	0,02	0,03

3.2 Funktionstauglichkeitsprüfung der Nadeln

Tabelle 34: Einstellungen der Dispenser nach Kalibrierung auf 100µl mit a.dem durch Fa. Peters.
Der eingestellte Druck beträgt 0,5 bar.

	100 µl	
Dispenser 1	m	n
Kamm 1	0.7920	-8.2550
Kamm 2	0.8210	-13.3800
Kamm 3	0.7600	-9.4660
Dispenser 2		
Kamm 1	0.7880	-7.3000
Kamm 2	0.8150	-8.8000
Kamm 3	0.7930	-11.3700
Dispenser 3		
Kamm 1	0.8010	-6.9770
Kamm 2	0.7540	-7.5880
Kamm 3	0.7640	-11.8800

3.3 Dispensierverhalten der Nadeln

Tabelle 35: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 1, Kamm 1.

Nadel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,604	0,618	0,617	0,628	0,626	0,628	0,618	0,629	0,624	0,627	0,639	0,636
B	0,636	0,637	0,630	0,637	0,637	0,636	0,625	0,640	0,632	0,632	0,650	0,646
C	0,649	0,646	0,641	0,647	0,644	0,641	0,631	0,647	0,640	0,639	0,657	0,654
D	0,645	0,641	0,630	0,641	0,632	0,636	0,627	0,638	0,632	0,632	0,647	0,644
E	0,636	0,633	0,626	0,632	0,627	0,629	0,623	0,629	0,631	0,626	0,640	0,641
F	0,643	0,640	0,634	0,642	0,637	0,637	0,628	0,644	0,635	0,634	0,649	0,650
G	0,636	0,639	0,623	0,638	0,637	0,633	0,617	0,639	0,633	0,625	0,642	0,637
H	0,626	0,644	0,640	0,651	0,653	0,652	0,646	0,647	0,649	0,641	0,660	0,653

Tabelle 36: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der einzelnen Nadeln von D1, K1.
 Dargestellt ist die Abweichung der Einzeldispensionen von deren Mittelwert.
 Die Abweichung liegt bei diesem Kamm innerhalb der geforderten Grenzen ($\pm 2\%$).

Nadel	Mittelwert aus Messung 1 - 12	zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
A	0,625	0,01	1,49%
B	0,637	0,01	1,06%
C	0,645	0,01	1,09%
D	0,637	0,01	1,03%
E	0,631	0,01	0,89%
F	0,639	0,01	1,02%
G	0,633	0,01	1,20%
H	0,647	0,01	1,34%

Tabelle 37: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D1, K1.
 Die Nadeln A - H geben das gleiche Volumen mit einer Abweichung von $\pm 1\%$ ab.

Mittelwert aller Ergebnisse aus Nadel A - H	0,637
Zufällige Messabweichung	0,01
Variationskoeffizient	1,14%

Tabelle 38: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 1, Kamm 2

Nadel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,631	0,635	0,639	0,644	0,629	0,641	0,627	0,626	0,624	0,631	0,645	0,641
B	0,643	0,645	0,649	0,647	0,643	0,643	0,629	0,631	0,627	0,633	0,646	0,645
C	0,654	0,657	0,659	0,658	0,642	0,644	0,636	0,637	0,633	0,637	0,651	0,651
D	0,662	0,659	0,662	0,653	0,649	0,651	0,635	0,628	0,632	0,639	0,646	0,648
E	0,657	0,660	0,652	0,658	0,641	0,650	0,635	0,631	0,634	0,635	0,652	0,651
F	0,655	0,663	0,656	0,656	0,645	0,648	0,634	0,632	0,631	0,633	0,649	0,649
G	0,645	0,646	0,641	0,646	0,640	0,637	0,623	0,630	0,628	0,626	0,640	0,640
H	0,642	0,656	0,654	0,656	0,644	0,651	0,640	0,622	0,628	0,624	0,645	0,640

Tabelle 39: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D1, K2.
 Dargestellt ist die Abweichung der Einzeldispensionen von deren Mittelwert.
 Die Abweichung liegt bei diesem Kamm innerhalb der geforderten Grenzen ($\pm 2\%$).

Nadel	Mittelwert aus Messung 1 - 12	Zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
A	0,634	0,01	1,16%
B	0,640	0,01	1,21%
C	0,647	0,01	1,47%
D	0,647	0,01	1,77%
E	0,646	0,01	1,62%
F	0,646	0,01	1,70%
G	0,637	0,01	1,27%
H	0,642	0,01	1,85%

Tabelle 40: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D1, K2.
 Die Nadeln A - H geben das gleiche Volumen mit einer Abweichung von $\pm 1\%$ ab.

Mittelwert aller Ergebnisse aus Nadel A - H	0,643
Zufällige Messabweichung	0,01
Variationskoeffizient	0,76%

Tabelle 41: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 1, Kamm 3.

Nadel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,650	0,647	0,638	0,648	0,644	0,637	0,631	0,643	0,643	0,645	0,657	0,653
B	0,664	0,668	0,657	0,665	0,661	0,650	0,641	0,660	0,653	0,657	0,671	0,663
C	0,653	0,654	0,642	0,65	0,642	0,634	0,627	0,641	0,638	0,642	0,654	0,648
D	0,653	0,652	0,640	0,653	0,645	0,637	0,626	0,638	0,639	0,641	0,650	0,648
E	0,666	0,662	0,647	0,657	0,646	0,640	0,633	0,646	0,648	0,647	0,662	0,658
F	0,662	0,667	0,650	0,659	0,652	0,645	0,631	0,649	0,647	0,647	0,662	0,656
G	0,663	0,664	0,646	0,664	0,657	0,642	0,631	0,657	0,656	0,651	0,664	0,659
H	0,644	0,654	0,645	0,652	0,650	0,644	0,633	0,638	0,644	0,636	0,655	0,643

Tabelle 42: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D1, K3.

Dargestellt ist die Abweichung der Einzeldispensionen von deren Mittelwert.

Die Abweichung liegt bei diesem Kamm innerhalb der geforderten Grenzen ($\pm 2\%$).

Nadel	Mittelwert aus Messung 1 - 12	zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
A	0,645	0,01	1,11%
B	0,659	0,01	1,26%
C	0,644	0,01	1,31%
D	0,644	0,01	1,27%
E	0,651	0,01	1,53%
F	0,652	0,01	1,49%
G	0,655	0,01	1,58%
H	0,645	0,01	1,08%

Tabelle 43: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D1, K3.

Die Nadeln A - H geben das gleiche Volumen mit einer Abweichung von $\pm 1\%$ ab.

Mittelwert aller Ergebnisse aus Nadel A - H	0,649
Zufällige Messabweichung	0,01
Variationskoeffizient	0,59%

Tabelle 44: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 2, Kamm 1.

Nadel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,625	0,635	0,633	0,637	0,637	0,633	0,625	0,630	0,621	0,625	0,636	0,628
B	0,628	0,635	0,631	0,637	0,636	0,633	0,620	0,633	0,619	0,625	0,638	0,609
C	0,638	0,646	0,648	0,651	0,648	0,642	0,631	0,640	0,629	0,633	0,643	0,639
D	0,627	0,631	0,624	0,633	0,640	0,637	0,623	0,630	0,623	0,629	0,640	0,638
E	0,633	0,640	0,639	0,641	0,640	0,639	0,627	0,631	0,628	0,627	0,636	0,635
F	0,642	0,648	0,649	0,655	0,654	0,649	0,637	0,645	0,629	0,636	0,644	0,642
G	0,635	0,638	0,630	0,640	0,646	0,629	0,616	0,633	0,623	0,618	0,629	0,624
H	0,628	0,645	0,644	0,649	0,651	0,648	0,636	0,633	0,629	0,625	0,640	0,628

Tabelle 45: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D2, K1.
 Dargestellt ist die Abweichung der Einzeldispensionen von deren Mittelwert.
 Die Abweichung liegt bei diesem Kamm innerhalb der geforderten Grenzen ($\pm 2\%$).

Nadel	Mittelwert aus Messung 1 - 12	zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
A	0,630	0,01	0,88%
B	0,629	0,01	1,41%
C	0,641	0,01	1,10%
D	0,631	0,01	1,01%
E	0,635	0,01	0,84%
F	0,644	0,01	1,18%
G	0,630	0,01	1,42%
H	0,638	0,01	1,46%

Tabelle 46: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D2, K1.
 Die Nadeln A - H geben das gleiche Volumen mit einer Abweichung von $\pm 1\%$ ab.

Mittelwert aller Ergebnisse aus Nadel A - H	0,635
Zufällige Messabweichung	0,01
Variationskoeffizient	0,89%

Tabelle 47: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 2, Kamm 2.

Nadel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,645	0,660	0,647	0,658	0,649	0,658	0,650	0,659	0,649	0,656	0,666	0,661
B	0,653	0,657	0,648	0,654	0,648	0,640	0,647	0,640	0,644	0,651	0,667	0,648
C	0,657	0,667	0,632	0,665	0,643	0,659	0,649	0,655	0,648	0,650	0,670	0,662
D	0,647	0,654	0,651	0,660	0,654	0,657	0,651	0,654	0,647	0,652	0,665	0,659
E	0,658	0,668	0,652	0,666	0,657	0,662	0,655	0,658	0,650	0,656	0,669	0,661
F	0,652	0,669	0,643	0,653	0,645	0,649	0,643	0,651	0,640	0,642	0,658	0,650
G	0,653	0,661	0,639	0,657	0,648	0,646	0,639	0,656	0,645	0,643	0,656	0,650
H	0,631	0,649	0,637	0,651	0,646	0,653	0,646	0,643	0,638	0,635	0,654	0,642

Tabelle 48: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D2, K2.
 Dargestellt ist die Abweichung der Einzeldispensionen von deren Mittelwert.
 Die Abweichung liegt bei diesem Kamm innerhalb der geforderten Grenzen ($\pm 2\%$).

Nadel	Mittelwert aus Messung 1 - 12	zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
A	0,655	0,01	1,01%
B	0,650	0,01	1,16%
C	0,655	0,01	1,67%
D	0,654	0,01	0,81%
E	0,659	0,01	0,92%
F	0,650	0,01	1,25%
G	0,649	0,01	1,12%
H	0,644	0,01	1,15%

Tabelle 49: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D2, K2.
 Die Nadeln A - H geben das gleiche Volumen mit einer Abweichung von $\pm 1\%$ ab.

Mittelwert aller Ergebnisse aus Nadel A - H	0,652
zufällige Messabweichung	0,00
Variationskoeffizient	0%

Tabelle 50: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 2, Kamm 3.

Nadel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,636	0,642	0,641	0,649	0,640	0,641	0,637	0,640	0,638	0,645	0,651	0,645
B	0,636	0,636	0,634	0,640	0,637	0,635	0,624	0,635	0,633	0,638	0,647	0,644
C	0,633	0,637	0,633	0,637	0,633	0,631	0,617	0,628	0,625	0,632	0,641	0,639
D	0,642	0,649	0,641	0,645	0,644	0,642	0,627	0,634	0,634	0,642	0,648	0,646
E	0,629	0,631	0,627	0,628	0,627	0,626	0,616	0,620	0,621	0,623	0,631	0,634
F	0,636	0,637	0,632	0,639	0,637	0,633	0,622	0,628	0,626	0,632	0,638	0,638
G	0,629	0,639	0,627	0,640	0,638	0,627	0,616	0,632	0,632	0,628	0,637	0,634
H	0,634	0,651	0,644	0,649	0,649	0,646	0,635	0,633	0,637	0,638	0,648	0,643

Tabelle 51: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D2, K3.

Dargestellt ist die Abweichung der Einzeldispensionen von deren Mittelwert.

Die Abweichung liegt bei diesem Kamm innerhalb der geforderten Grenzen ($\pm 2\%$).

Nadel	Mittelwert aus Messung 1 - 12	zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
A	0,642	0,00	0,00%
B	0,637	0,01	0,90%
C	0,632	0,01	1,04%
D	0,641	0,01	1,01%
E	0,626	0,01	0,83%
F	0,633	0,01	0,86%
G	0,632	0,01	1,07%
H	0,642	0,01	1,02%

Tabelle 52: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D2, K3.

Die Nadeln A - H geben das gleiche Volumen mit einer Abweichung von $\pm 1\%$ ab.

Mittelwert aller Ergebnisse aus Nadel A - H	0,636
zufällige Messabweichung	0,01
Variationskoeffizient	0,93%

Tabelle 53: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 3, Kamm 1.

Nadel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,649	0,653	0,637	0,660	0,647	0,670	0,644	0,675	0,655	0,672	0,675	0,672
B	0,654	0,658	0,644	0,649	0,670	0,655	0,666	0,659	0,669	0,658	0,674	0,658
C	0,644	0,645	0,633	0,643	0,638	0,643	0,637	0,648	0,645	0,650	0,653	0,647
D	0,648	0,648	0,631	0,644	0,641	0,642	0,639	0,647	0,643	0,643	0,653	0,645
E	0,642	0,647	0,632	0,640	0,635	0,639	0,634	0,649	0,646	0,646	0,654	0,642
F	0,661	0,665	0,653	0,664	0,665	0,667	0,661	0,675	0,671	0,675	0,678	0,669
G	0,672	0,673	0,667	0,668	0,671	0,674	0,668	0,677	0,673	0,677	0,682	0,664
H	0,653	0,659	0,641	0,658	0,656	0,659	0,646	0,668	0,663	0,663	0,668	0,658

Tabelle 54: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D3, K1.
 Dargestellt ist die Abweichung der Einzeldispensionen von deren Mittelwert.
 Die Abweichung liegt bei diesem Kamm innerhalb der geforderten Grenzen ($\pm 2\%$).

Nadel	Mittelwert aus Messung 1 - 12	zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
A	0,659	0,01	2,00%
B	0,660	0,01	1,34%
C	0,644	0,01	0,88%
D	0,644	0,01	0,85%
E	0,642	0,01	1,02%
F	0,667	0,01	1,06%
G	0,672	0,01	0,75%
H	0,658	0,01	1,22%

Tabelle 55: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D3, K1.
 Die Nadeln A - H geben das gleiche Volumen mit einer Abweichung von $\pm 2\%$ ab.

Mittelwert aller Ergebnisse aus Nadel A – H	0,656
Zufällige Messabweichung	0,01
Variationskoeffizient	1,73%

Tabelle 56: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 3, Kamm 2.

Nadel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,644	0,654	0,649	0,669	0,654	0,652	0,632	0,646	0,631	0,644	0,647	0,655
B	0,653	0,665	0,663	0,672	0,662	0,656	0,638	0,657	0,636	0,648	0,654	0,662
C	0,663	0,671	0,670	0,680	0,668	0,659	0,645	0,660	0,644	0,652	0,657	0,667
D	0,645	0,655	0,652	0,661	0,655	0,646	0,630	0,640	0,627	0,638	0,638	0,650
E	0,643	0,651	0,643	0,652	0,645	0,641	0,623	0,631	0,621	0,630	0,637	0,647
F	0,651	0,656	0,652	0,665	0,656	0,650	0,631	0,645	0,631	0,645	0,644	0,655
G	0,640	0,654	0,642	0,661	0,651	0,638	0,619	0,640	0,627	0,629	0,634	0,640
H	0,636	0,659	0,652	0,663	0,658	0,652	0,634	0,636	0,627	0,633	0,640	0,643

Tabelle 57: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D3, K2.
 Dargestellt ist die Abweichung der Einzeldispensionen von deren Mittelwert.
 Die Abweichung liegt bei diesem Kamm innerhalb der geforderten Grenzen ($\pm 2\%$).

Nadel	Mittelwert aus Messung 1 - 12	zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
A	0,648	0,01	1,59%
B	0,656	0,01	1,63%
C	0,661	0,01	1,63%
D	0,645	0,01	1,62%
E	0,639	0,01	1,62%
F	0,648	0,01	1,55%
G	0,640	0,01	1,84%
H	0,644	0,01	1,85%

Tabelle 58: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D3, K2.
 Die Nadeln A - H geben das gleiche Volumen mit einer Abweichung von $\pm 1\%$ ab.

Mittelwert aller Ergebnisse aus Nadel A – H	0,648
zufällige Messabweichung	0,01
Variationskoeffizient	1,19%

Tabelle 59: Messergebnisse der optischen Dichte von Dispenser 3, Kamm 3.

Nadel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,658	0,656	0,646	0,657	0,650	0,653	0,646	0,661	0,647	0,656	0,665	0,649
B	0,661	0,661	0,649	0,658	0,653	0,654	0,646	0,669	0,649	0,659	0,666	0,643
C	0,664	0,663	0,651	0,659	0,652	0,653	0,643	0,666	0,651	0,659	0,663	0,644
D	0,661	0,653	0,642	0,657	0,651	0,653	0,642	0,662	0,648	0,654	0,658	0,640
E	0,666	0,668	0,652	0,662	0,656	0,661	0,652	0,669	0,653	0,658	0,666	0,650
F	0,655	0,654	0,641	0,650	0,645	0,648	0,636	0,658	0,645	0,648	0,656	0,638
G	0,658	0,668	0,646	0,663	0,657	0,653	0,642	0,672	0,657	0,654	0,659	0,643
H	0,638	0,651	0,637	0,647	0,645	0,646	0,642	0,651	0,638	0,640	0,650	0,639

Tabelle 60: Ergebnisse des Dispensierverhaltens der Nadeln A - H von D3, K3.

Dargestellt ist die Abweichung der Einzeldispensionen von deren Mittelwert.

Die Abweichung liegt bei diesem Kamm innerhalb der geforderten Grenzen ($\pm 2\%$).

Nadel	Mittelwert aus Messung 1 - 12	zufällige Messabweichung	Variationskoeffizient
A	0,654	0,01	0,95%
B	0,656	0,01	1,23%
C	0,656	0,01	1,19%
D	0,652	0,01	1,14%
E	0,659	0,01	1,04%
F	0,648	0,01	1,10%
G	0,656	0,01	1,41%
H	0,644	0,01	0,83%

Tabelle 61: Vergleich des Dispensierverhaltens zwischen den Nadeln von D3, K3.

Die Nadeln A - H geben das gleiche Volumen mit einer Abweichung von $\pm 1\%$ ab.

Mittelwert aller Ergebnisse aus Nadel A - H	0,653
Zufällige Messabweichung	0,01
Variationskoeffizient	0,78%

3.4 Justierung mit Reagenz

3.4.1 Dichtebestimmung Reagenzien

Tabelle 62: Messwerte der Dichtebestimmung der Reagenzien.

	BVD Ag			IBRgB			IBRgE		
	Konjugat	Substrat	Stopp	Konjugat	Substrat	Stopp	Konjugat	Substrat	Stopp
1	1,028	1,019	1,024	1,016	1,018	1,032	1,028	1,020	1,013
2	1,013	1,019	1,020	1,009	1,019	1,034	1,013	1,048	1,015
3	1,006	1,021	1,020	1,015	1,014	1,027	1,020	1,044	1,012
4	1,016	1,021	1,016	1,010	1,012	1,031	1,022	1,046	1,010
5	1,015	1,018	1,018	1,005	1,013	1,026	1,021	1,052	1,013
6	1,015	1,020	1,020	1,013	1,013	1,029	1,013	1,033	1,009
7	1,018	1,019	1,015	1,015	1,013	1,026	1,007	1,047	1,011
8	1,021	1,018	1,014	1,016	1,012	1,026	1,014	1,041	1,008
9	1,009	1,018	1,012	1,006	1,011	1,023	1,014	1,035	1,009
10	1,018	1,017	1,016	1,016	1,011	1,024	1,013	1,034	1,008

3.4.2 Eichkurven

Tabelle 63: Wertetabelle der Eichkurven für Dispenser 1.
Die Wägeergebnisse tragen die Einheit Gramm.

Zeit [ms]	100	225	350
Kamm 1			
1	6,930	16,168	25,362
2	6,990	16,184	25,321
3	6,972	16,191	25,300
Kamm 2			
1	6,738	15,951	25,285
2	6,715	15,973	25,092
3	6,734	16,042	25,168
Kamm 3			
1	6,734	16,116	25,359
2	6,739	16,115	25,305
3	6,741	16,151	25,328

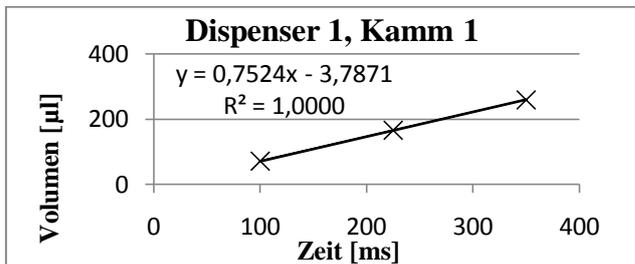


Abbildung 42: Eichkurve Reagenzien, D1, K1.
Es wurde das Konjugat von IBRgE verwendet.

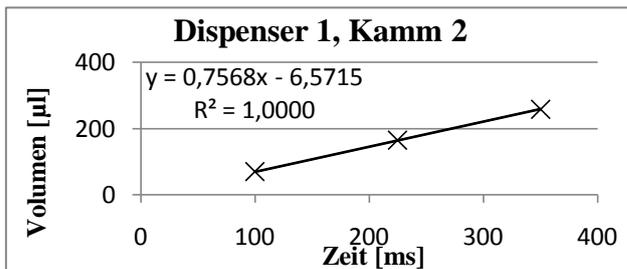


Abbildung 43: Eichkurve Reagenzien, D1, K2.
Es wurde das Konjugat von BVD Ag verwendet.

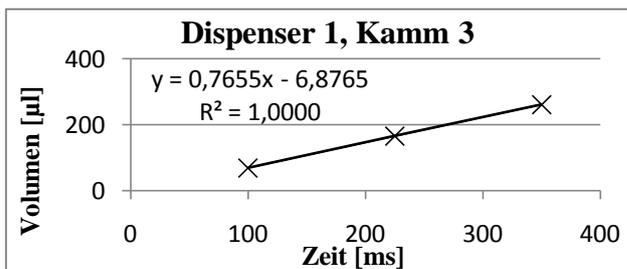


Abbildung 44: Eichkurve Reagenzien, D1, K3.
Es wurde das Konjugat von IBRgB verwendet.

Tabelle 64: Wertetabelle der Eichkurven für Dispenser 2.
Die Wägeregebnisse tragen die Einheit Gramm.

Zeit [ms]	100	225	350
Kamm 1			
1	6,301	15,191	24,077
2	6,301	15,192	24,010
3	6,282	15,197	24,018
Kamm 2			
1	7,139	16,823	26,458
2	7,132	16,815	26,493
3	7,122	16,822	26,434
Kamm 3			
1	6,615	15,724	24,832
2	6,616	15,741	24,822
3	6,621	15,747	24,801

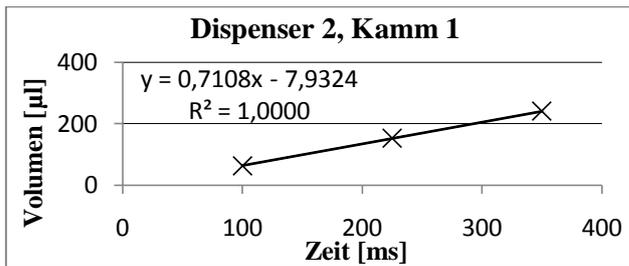


Abbildung 45: Eichkurve Reagenzien, D2, K1.
Es wurde das Substrat von IBRgE verwendet.

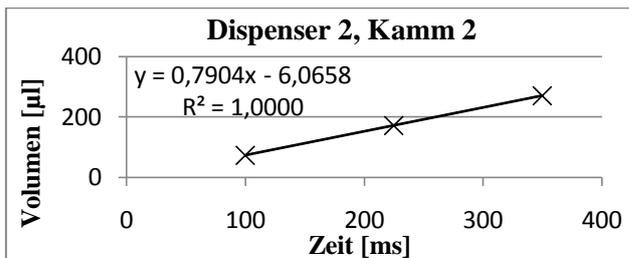


Abbildung 46: Eichkurve Reagenzien, D2, K2.
Es wurde das Substrat von BVD Ag verwendet.

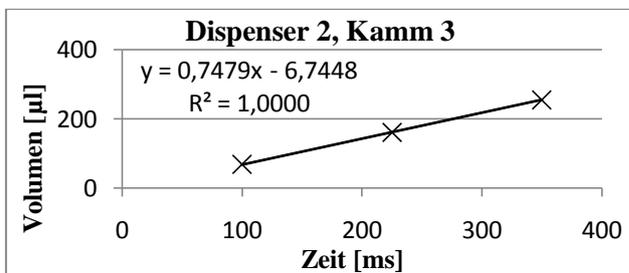


Abbildung 47: Eichkurve Reagenzien, D2, K3.
Es wurde das Substrat von IBRgB verwendet.

Tabelle 65: Wertetabellen der Eichkurven für Dispenser 3.
Die Wägebearbeitungen tragen die Einheit Gramm.

Zeit [ms]	250	350	450
Kamm 1			
1	6,415	9,267	12,108
2	6,462	9,287	11,964
3	6,443	9,217	11,956
Kamm 2			
1	5,899	8,641	11,361
2	5,906	8,608	11,366
3	5,897	8,580	11,283
Kamm 3			
1	5,777	8,419	11,025
2	5,750	8,436	11,028
3	5,764	8,387	11,028

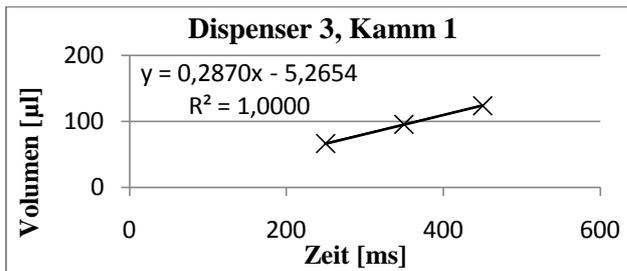


Abbildung 48: Eichkurve Reagenzien, D3, K1.
Es wurde die Stopplösung von IBRgE verwendet.

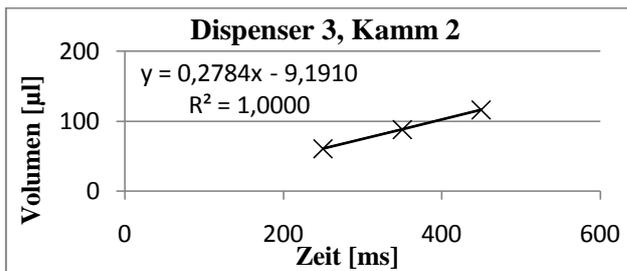


Abbildung 49: Eichkurve Reagenzien, D3, K2.
Es wurde die Stopplösung von BVD Ag verwendet.

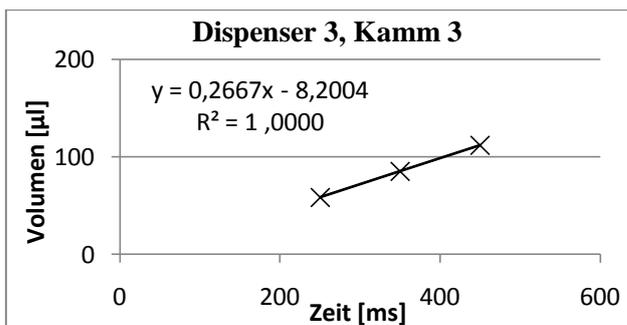


Abbildung 50: Eichkurve Reagenzien, D3, K3.
Es wurde die Stopplösung von IBRgB verwendet.

Tabelle 66: Übersicht der Einstellungen der Dispensierkämme.

Die Einstellungen beziehen sich auf die Beladung mit Reagenz. Der angegebene Druck ist der in den Schott-Flaschen erzeugte Luftdruck, der auf die Reagenzien ausgeübt wird.

	Druck [bar]	100µl	
Dispenser 1	0,5	m	n
Kamm 1		0,7524	-3,7871
Kamm 2		0,7568	-6,5715
Kamm 3		0,7655	-6,8765
Dispenser 2	0,5		
Kamm 1		0,7108	-7,9342
Kamm 2		0,7904	-6,0658
Kamm 3		0,7479	-6,7448
Dispenser 3	0,1		
Kamm 1		0,2870	-5,2654
Kamm 2		0,2784	-9,1910
Kamm 3		0,2667	-8,2004

Tabelle 67: Übersicht der Einstellungen der Dispensierkämme.

Die Einstellungen beziehen sich auf die Beladung mit Reagenz. Der angegebene Druck ist der in den Schottflaschen erzeugte Luftdruck, der auf die Reagenzien ausgeübt wird.

	Druck [bar]	100µl		
Dispenser 1	0,5	m	n	t [ms]
Kamm 1		0,7542	-3,7871	138
Kamm 2		0,7568	-6,5715	141
Kamm 3		0,7655	-6,8765	140
Dispenser 2	0,5			
Kamm 1		0,7108	-7,9342	152
Kamm 2		0,7904	-6,0658	134
Kamm 3		0,7479	-6,7448	143
Dispenser 3	0,1			
Kamm 1		0,2870	-5,2654	367
Kamm 2		0,2784	-9,1910	392
Kamm 3		0,2667	-8,2004	406

3.4.3 Gravimetrische Volumenkontrolle

Tabelle 68: Ergebnistabelle Volumenkontrolle.

Einwaage der dispensierten Volumina [g].

Kamm	Dispenser 1			Dispenser 2			Dispenser 3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	9,718	9,802	9,745	10,022	9,744	9,727	9,744	9,751	9,893
2	9,748	9,807	9,751	10,002	9,762	9,745	9,769	9,798	9,810
3	9,736	9,763	9,751	10,030	9,798	9,735	9,759	9,771	9,876
4	9,724	9,839	9,716	10,023	9,799	9,748	9,717	9,749	9,806
5	9,738	9,826	9,739	9,996	9,764	9,764	9,761	9,795	9,817
6	9,765	9,737	9,772	9,998	9,793	9,756	9,697	9,727	9,825
7	9,779	9,761	9,715	10,003	9,761	9,756	9,732	9,713	9,801
8	9,733	9,794	9,759	10,004	9,765	9,740	9,686	9,714	9,805
9	9,718	9,808	9,734	9,930	9,792	9,770	9,682	9,760	9,838
10	9,702	9,807	9,723	9,975	9,793	9,736	9,689	9,710	9,853

3.5 Befüllkontrolle

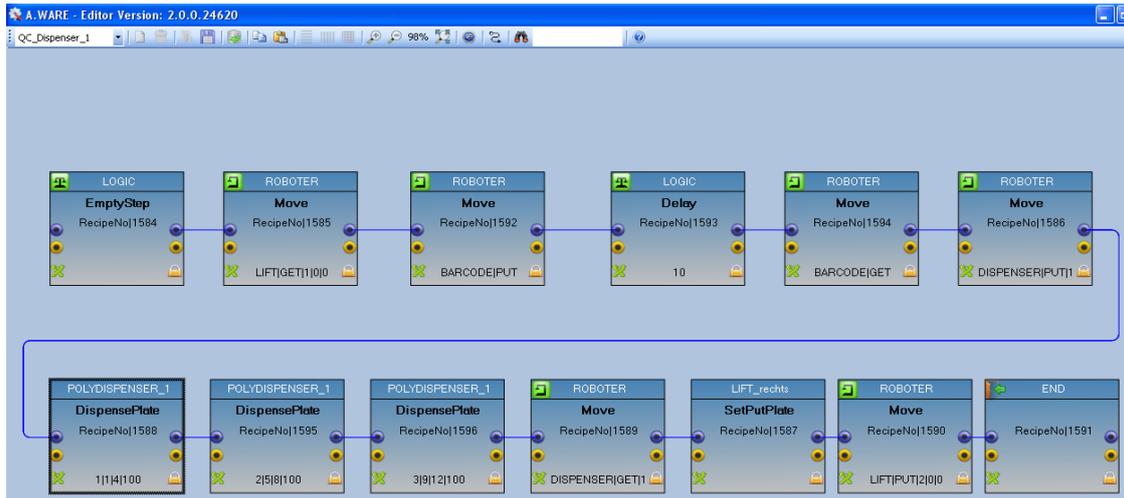


Abbildung 51: Screenshot Rezept QC_Dispenser_1.

Dargestellt ist die Befüllkontrolle von Dispenser 1. Der Aufbau erfolgt wie bei Rezept QC_Disps_1. Gleiche Schritte bedeuten dabei gleichen Inhalt. Alles andere:

ROBOTER|MOVE|DISPENSER|PUT/1: Der Roboterarm legt die Testplatte bei Dispenser 1 ab.

POLYDISPENSER_1|DispensePlate|1/1/4/100: Dispenser 1 dispensiert mit Kamm 1 jeweils 100µl in die Reihen 1 – 4. POLYDISPENSER_1|DispensePlate|2/5/8/100: Dispenser 1 dispensiert mit Kamm 2 jeweils 100µl in die Reihen 5 – 8. POLYDISPENSER_1|DispensePlate|3/9/12/100: Dispenser 1 dispensiert mit Kamm 3 jeweils 100µl in die Reihen 9 – 12. ROBOTER|MOVE|DISPENSER/GET/1: Der Roboterarm nimmt die Testplatte von Dispenser 1 auf.

Die Rezepte der Befüllkontrolle von Dispenser 2 und Dispenser 3 sind analog hierzu.

Tabelle 69: Ergebnistabelle Dispensionskontrolle Dispenser.

Das Rezept wird auch in der Wiederholung für jeden Dispenser und jeden Kamm korrekt durchgeführt.

Dispenser :	1			2			3		
Kamm :	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	OK								
2	OK								
3	OK								
4	OK								
5	OK								
6	OK								
7	OK								
8	OK								
9	OK								
10	OK								

3.6 Initialvolumen

Tabelle 70: Ergebnistabelle Zeitintervall Initialvolumen.

Bis zu einem Intervall von 10min mit einem Autodispenservolumen von 100µl entstehen keine Dispensierungenauigkeiten.

Zeit [min]	5	10	15
Dispenser 1			
Kamm 1	Ok	Ok	-
Kamm 2	Ok	Ok	-
Kamm 3	Ok	Ok	-
Dispenser 2			
Kamm 1	Ok	Ok	-
Kamm 2	Ok	Ok	-
Kamm 3	Ok	Ok	-
Dispenser 3			
Kamm 1	Ok	Ok	-
Kamm 2	Ok	Ok	-
Kamm 3	Ok	Ok	-

Tabelle 71: Ergebnistabelle Volumen Initialvolumen.

Bis zu einem Autodispenservolumen von 15µl mit einem Zeitintervall von 10min treten keine Dispensierungenauigkeiten auf.

Volumen [µl]	50	40	30	20	15	10
Dispenser 1						
Kamm 1	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	-
Kamm 2	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	-
Kamm 3	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	-
Dispenser 2						
Kamm 1	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	-
Kamm 2	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	-
Kamm 3	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	-
Dispenser 3						
Kamm 1	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	-
Kamm 2	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	-
Kamm 3	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok	-

3.7 Zuordnung Reagenzien

Tabelle 72: Reagenzkontrolle Assay BVD Ag.

Es wurden bei 10 Testplatten jeweils die richtigen Reagenzien in jedem Testschritt verwendet.

Testplatte	Konjugat		Substrat		Stopplösung	
	Dispenser	Reagenz	Dispenser	Reagenz	Dispenser	Reagenz
707073	1	OK	2	OK	3	OK
707068	1	OK	2	OK	3	OK
708653	1	OK	2	OK	3	OK
708654	1	OK	2	OK	3	OK
707070	1	OK	2	OK	3	OK
707053	1	OK	2	OK	3	OK
708652	1	OK	2	OK	3	OK
708646	1	OK	2	OK	3	OK
707066	1	OK	2	OK	3	OK
707067	1	OK	2	OK	3	OK

Tabelle 73: Reagenzkontrolle Assay IBRgB.

Es wurden bei 10 Testplatten jeweils die richtigen Reagenzien in jedem Testschritt verwendet.

Testplatte	Konjugat		Substrat		Stopplösung	
	Dispenser	Reagenz	Dispenser	Reagenz	Dispenser	Reagenz
125645	1	OK	2	OK	3	OK
125661	1	OK	2	OK	3	OK
125628	1	OK	2	OK	3	OK
124719	1	OK	2	OK	3	OK
124713	1	OK	2	OK	3	OK
124717	1	OK	2	OK	3	OK
125626	1	OK	2	OK	3	OK
125663	1	OK	2	OK	3	OK
125650	1	OK	2	OK	3	OK
125653	1	OK	2	OK	3	OK

Tabelle 74: Reagenzkontrolle Assay IBRgE.

Es wurden bei 10 Testplatten jeweils die richtigen Reagenzien in jedem Testschritt verwendet.

Testplatte	Konjugat		Substrat		Stopplösung	
	Dispenser	Reagenz	Dispenser	Reagenz	Dispenser	Reagenz
147756	1	OK	2	OK	3	OK
147754	1	OK	2	OK	3	OK
147749	1	OK	2	OK	3	OK
147755	1	OK	2	OK	3	OK
147761	1	OK	2	OK	3	OK
147759	1	OK	2	OK	3	OK
147758	1	OK	2	OK	3	OK
147757	1	OK	2	OK	3	OK
147762	1	OK	2	OK	3	OK
147753	1	OK	2	OK	3	OK

Tabelle 75: Reagenzkontrolle gemischte Assays.

Bei der parallelen Abarbeitung mehrerer Assays wird jeweils der richtige Dispenser als auch das richtige Reagenz verwendet.

Testplatte	Konjugat		Substrat		Stopplösung	
	Dispenser	Reagenz	Dispenser	Reagenz	Dispenser	Reagenz
147754	1	OK	2	OK	3	OK
125645	1	OK	2	OK	3	OK
707053	1	OK	2	OK	3	OK
147761	1	OK	2	OK	3	OK
125661	1	OK	2	OK	3	OK
707067	1	OK	2	OK	3	OK
147749	1	OK	2	OK	3	OK
125628	1	OK	2	OK	3	OK
707066	1	OK	2	OK	3	OK
147759	1	OK	2	OK	3	OK
708652	1	OK	2	OK	3	OK
124713	1	OK	2	OK	3	OK
147755	1	OK	2	OK	3	OK
708646	1	OK	2	OK	3	OK
124719	1	OK	2	OK	3	OK

4 Photometer

4.1 BVD Ag

4.1.1 Prozedur

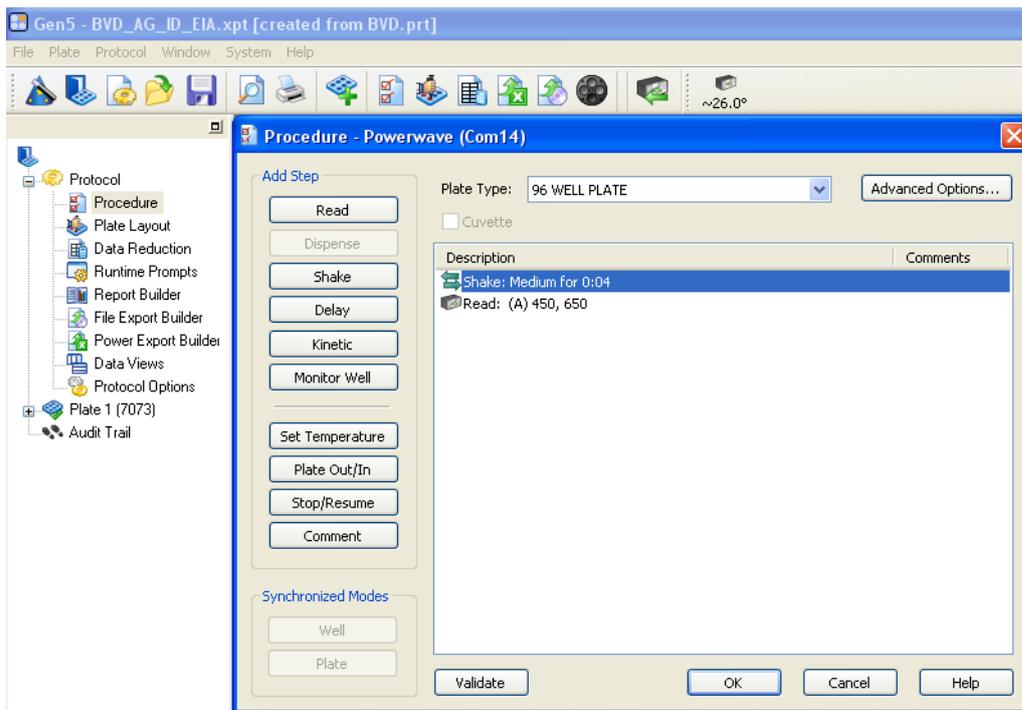


Abbildung 52: Screenshot der Messprozedur für BVD Ag.

Die Testplatte wird zunächst für 4 Sekunden geschüttelt und anschließend sowohl bei 450nm als auch bei 650nm gemessen.

4.1.2 Plattenlayout

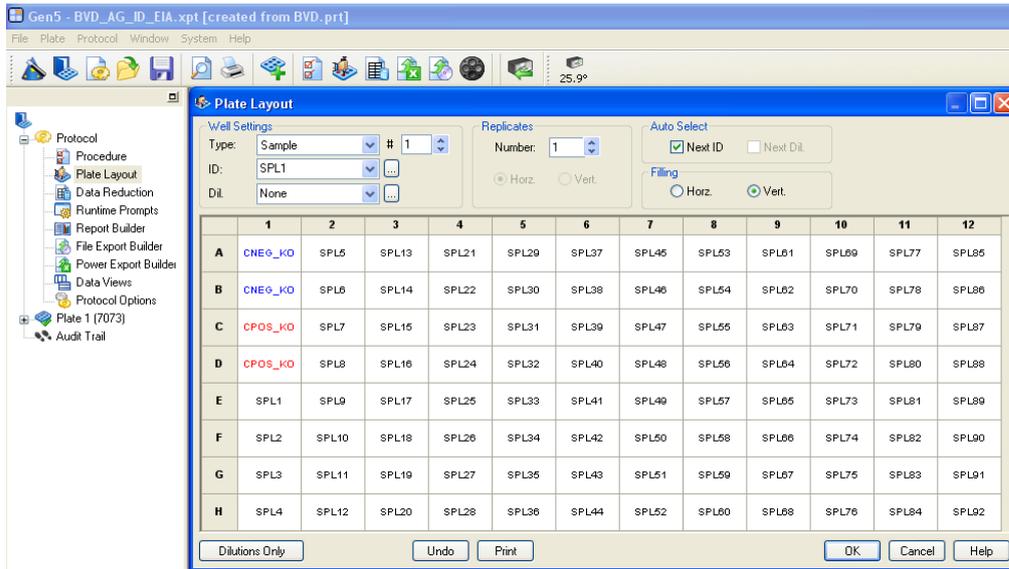


Abbildung 53: Plattenlayout für BVD Ag.

Die Positionen A1 und B1 sind für die negative Kontrolle, die Positionen C1 und D1 für die positive Kontrolle belegt. Die restlichen Positionen sind als SPL = Sample definiert.

4.1.3 Transformation

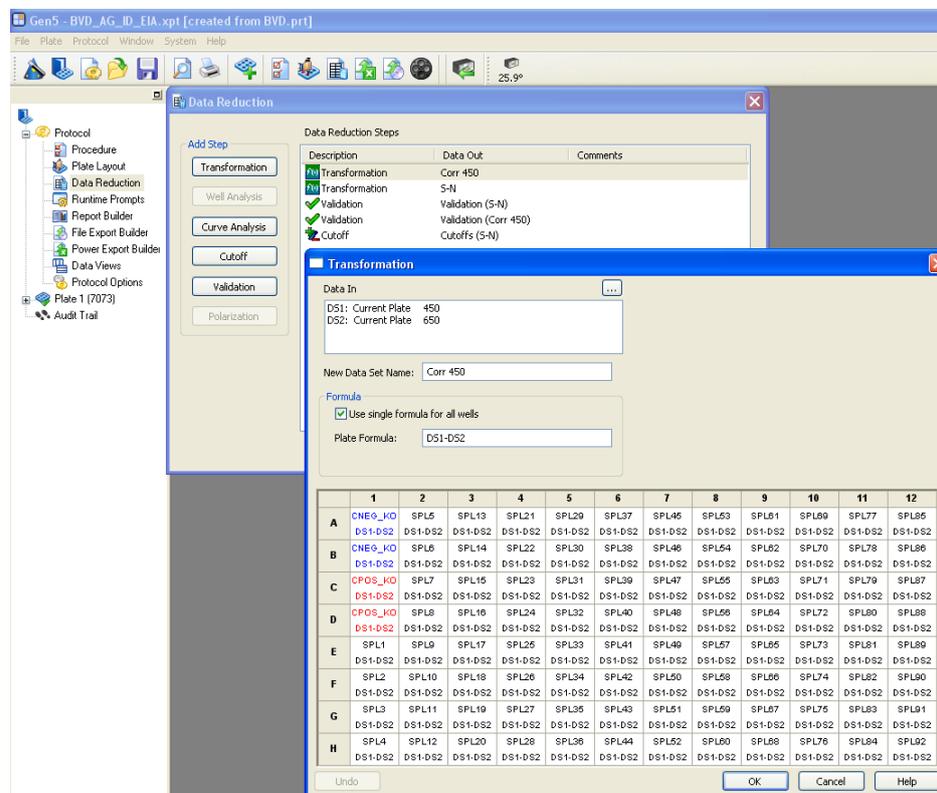


Abbildung 54: Berechnung des korrigierten OD – Wertes für BVD Ag.

Der Messwert bei 650nm wird von dem Messwert bei 450nm abgezogen. Dies entspricht einem Abzug des Leerwertes. Es wird der Corr450 Wert für Proben und Kontrollen erhalten.

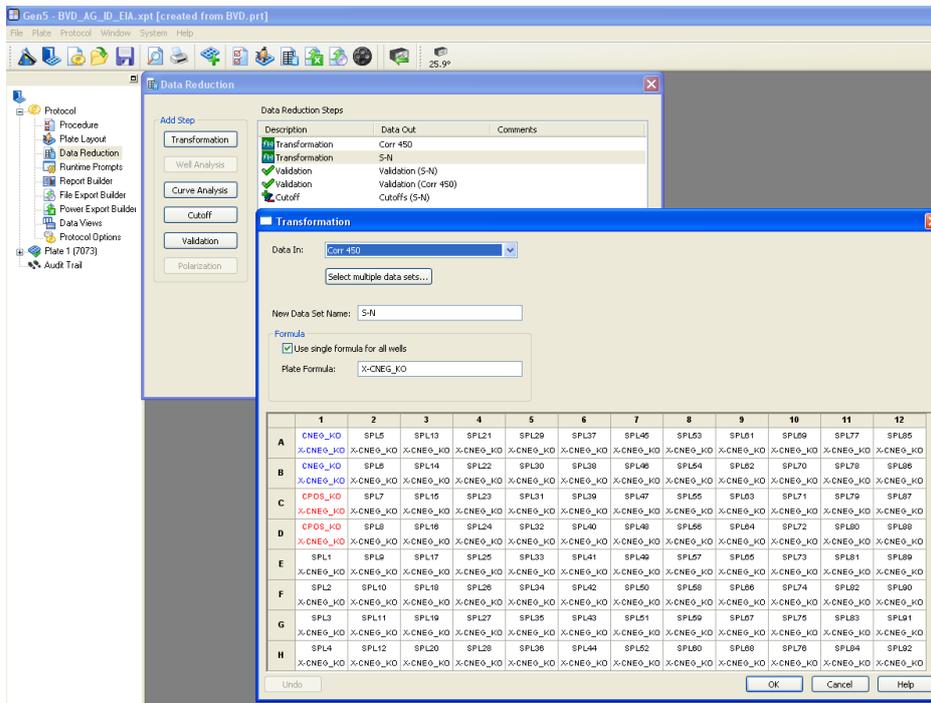


Abbildung 55: Berechnung des S-N – Wertes für BVD Ag.
 Der Mittelwert der korrigierten negativen Kontrollen wird von dem korrigierten OD – Wert der Proben abgezogen.

4.1.4 Validierung

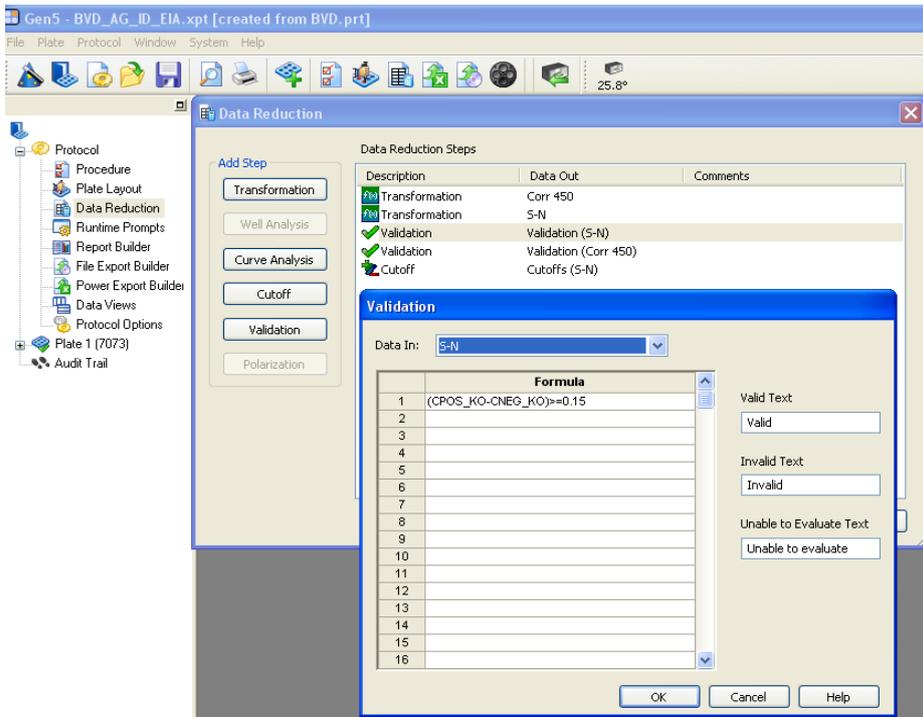


Abbildung 56: Festlegung der ersten Validierungsbedingung für BVD Ag.
 Nur wenn die Differenz zwischen den Mittelwerten der positiven und negativen Kontrollen größer oder gleich 0,15 ist die Testplatte gültig und die Probenergebnisse vertrauensvoll.

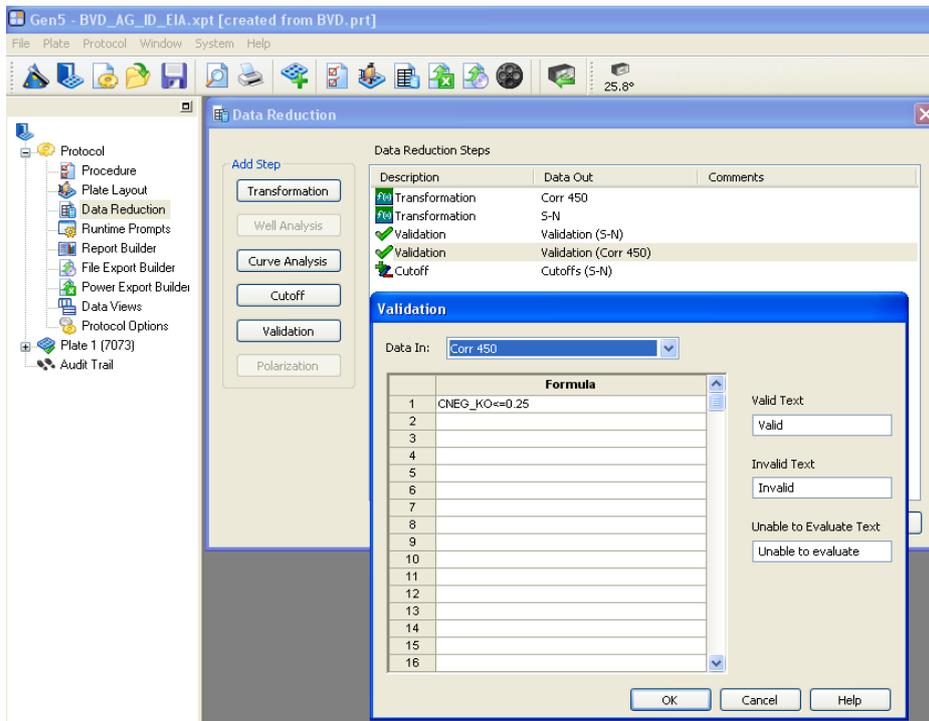


Abbildung 57: Festlegung der zweiten Validierungsbedingung für BVD Ag.
 Nur wenn der korrigierte OD – Wert der negativen Kontrolle kleiner oder gleich 0,25 ist, ist der Test gültig und die Probenergebnisse vertrauensvoll.

4.1.5 CutOFF

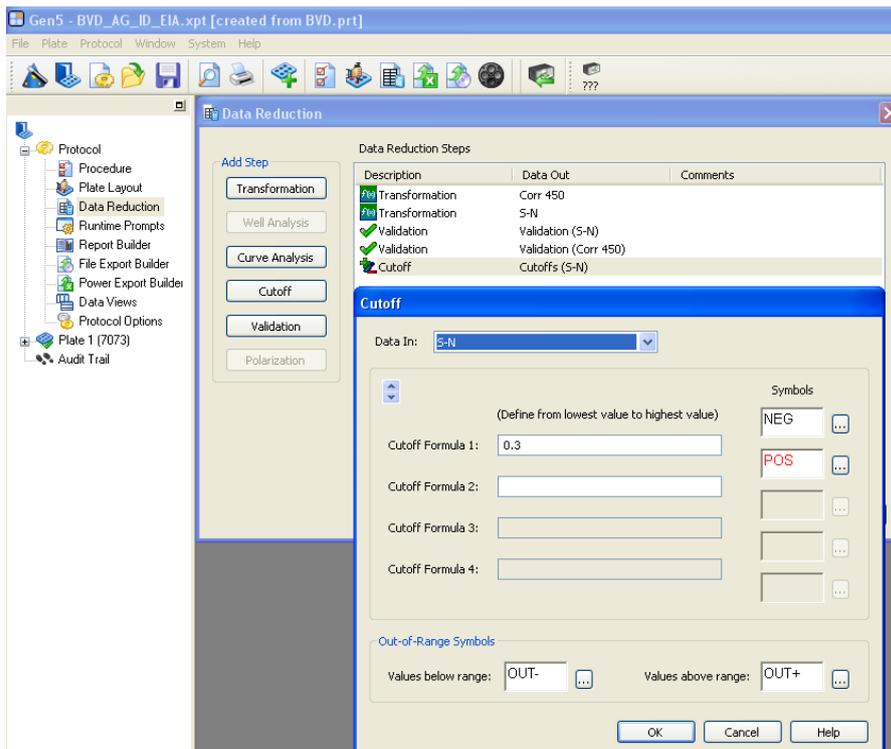


Abbildung 58: Festlegung des Grenzwertes zwischen positivem und negativem Probenergebnis für BVD Ag.
 Proben, deren S-N – Wert kleiner 0,3 sind werden als negativ gewertet. Proben, deren S-N – Wert größer als 0,3 ist werden als positiv gewertet.

4.2 IBRgB

4.2.1 Prozedur

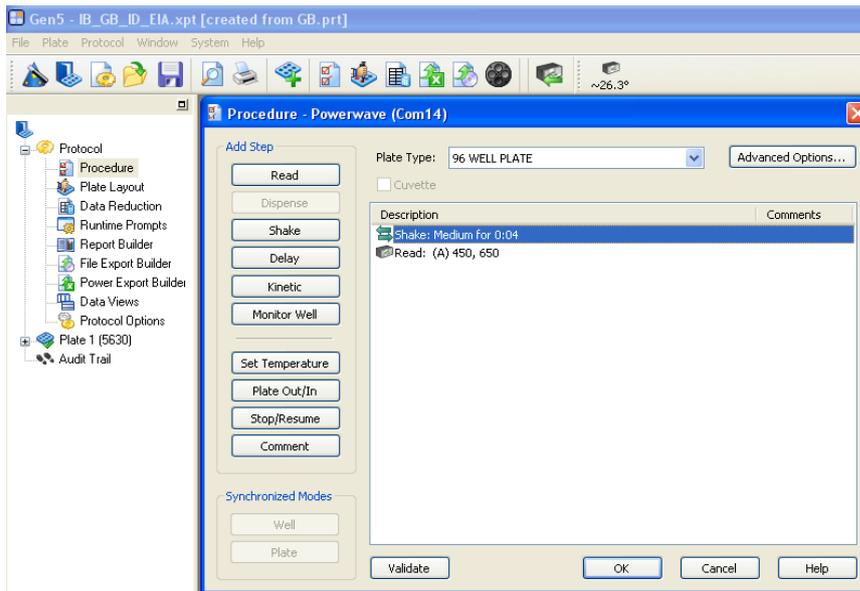


Abbildung 59: Screenshot der Messprozedur für IBRgB.

Die Testplatte wird zunächst für 4 Sekunden geschüttelt und anschließend sowohl bei 450nm als auch bei 650nm gemessen.

4.2.2 Plattenlayout

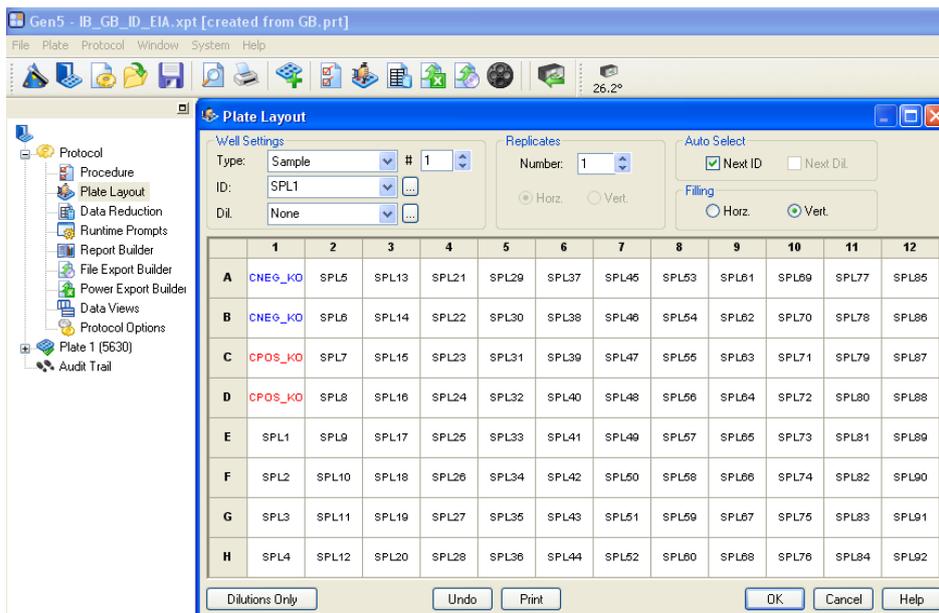


Abbildung 60: Plattenlayout für IBRgB.

Die Positionen A1 und B1 sind für die negative Kontrolle, die Positionen C1 und D1 für die positive Kontrolle belegt. Die restlichen Positionen sind als SPL = Sample definiert.

4.2.3 Transformation

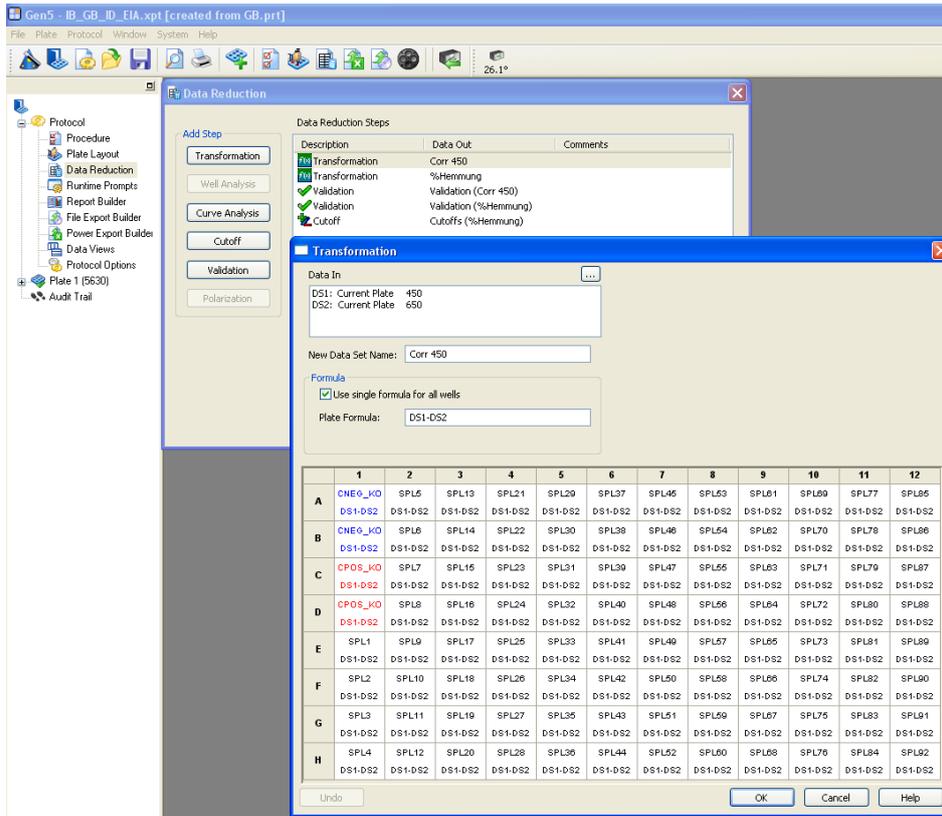


Abbildung 61: Berechnung des korrigierten OD – Wertes für IBRgB. Der Messwert bei 650nm wird von dem Messwert bei 450nm abgezogen. Dies entspricht einem Abzug des Leerwertes. Es wird der Corr450 Wert für Proben und Kontrollen erhalten.

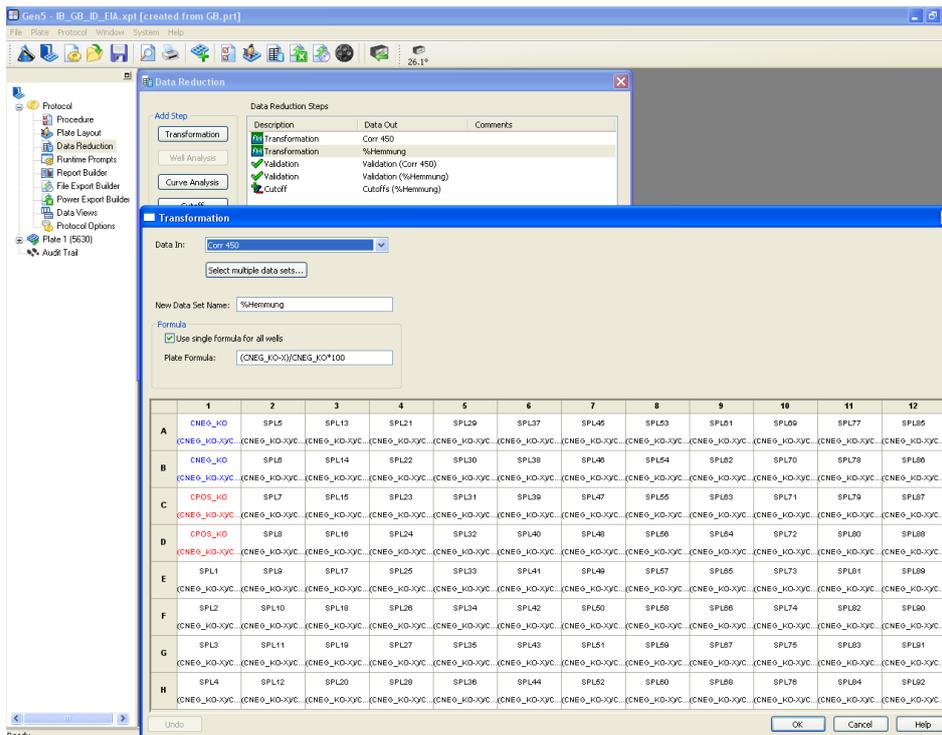


Abbildung 62: Berechnung der prozentualen Blockierung durch die Probe für IBRgB. Die prozentuale Hemmung wird auf Grundlage des korrigierten OD – Wertes der Probe und dem Mittelwert der korrigierten negativen Kontrollen berechnet.

4.3.4 Validierung

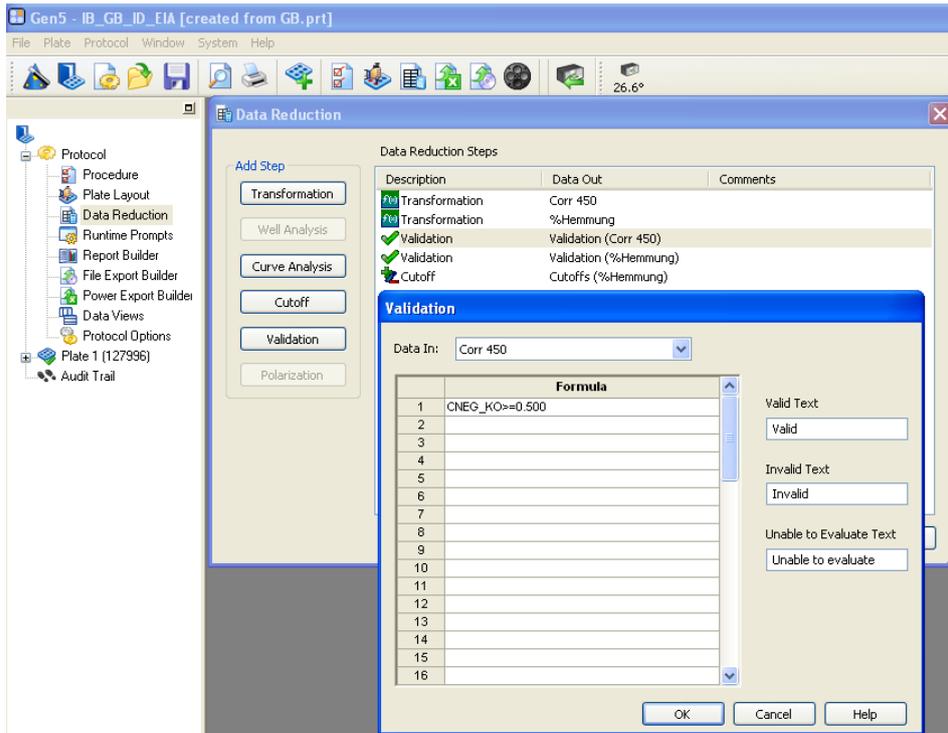


Abbildung 63: Festlegung der ersten Validierungsbedingungen für IBRgB.
Nur wenn der Mittelwert der korrigierten negativen Kontrolle größer oder gleich 0,500 ist, ist der Test gültig und die Probenergebnisse vertrauensvoll.

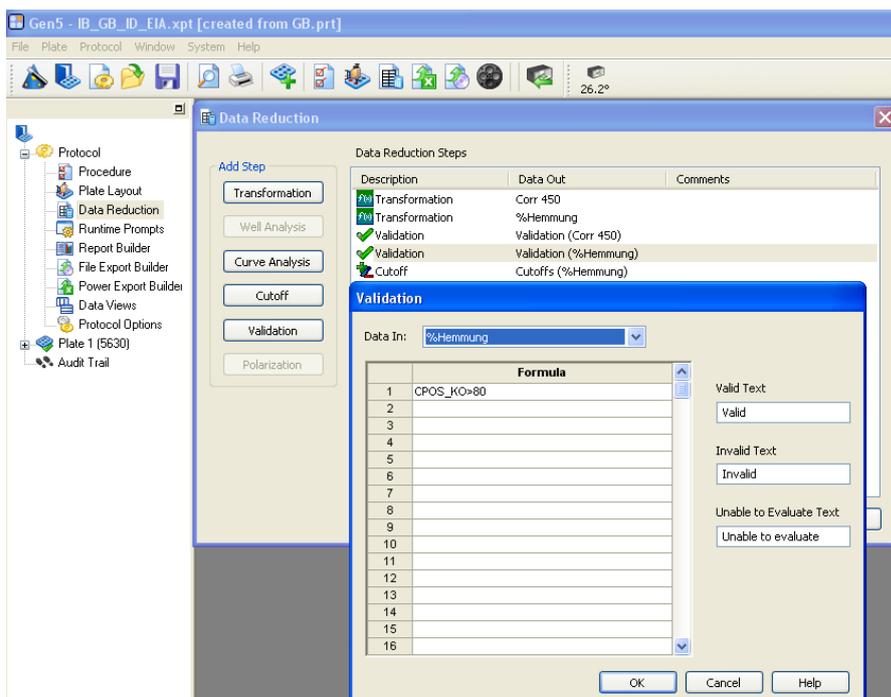


Abbildung 64: Festlegung der zweiten Validierungsbedingungen für IBRgB.
Nur wenn die prozentuale Hemmung des Mittelwerts der korrigierten positiven Kontrolle größer oder gleich 80% ist, ist der Test gültig und die Probenergebnisse vertrauensvoll.

4.2.5 CutOFF

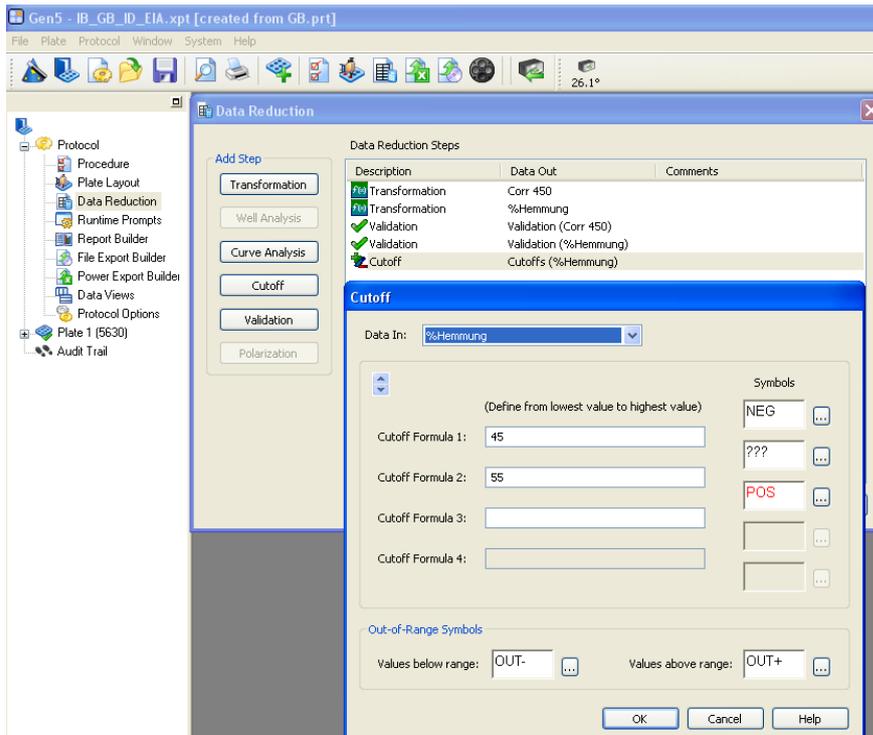


Abbildung 65: Festlegung der Grenzwerte zwischen negativem, fraglichem und positivem Ergebnis der Probe für IBRgB.

Beträgt die prozentuale Hemmung der Probe unter 45% so ist diese als negativ zu werten. Liegt der Hemmwert zwischen 45 und 55% liegt ein fragliches Ergebnis vor. Bei Hemmwerten über 55% wird die Probe als positiv gewertet.

4.3 IBRgE

4.3.1 Procedure

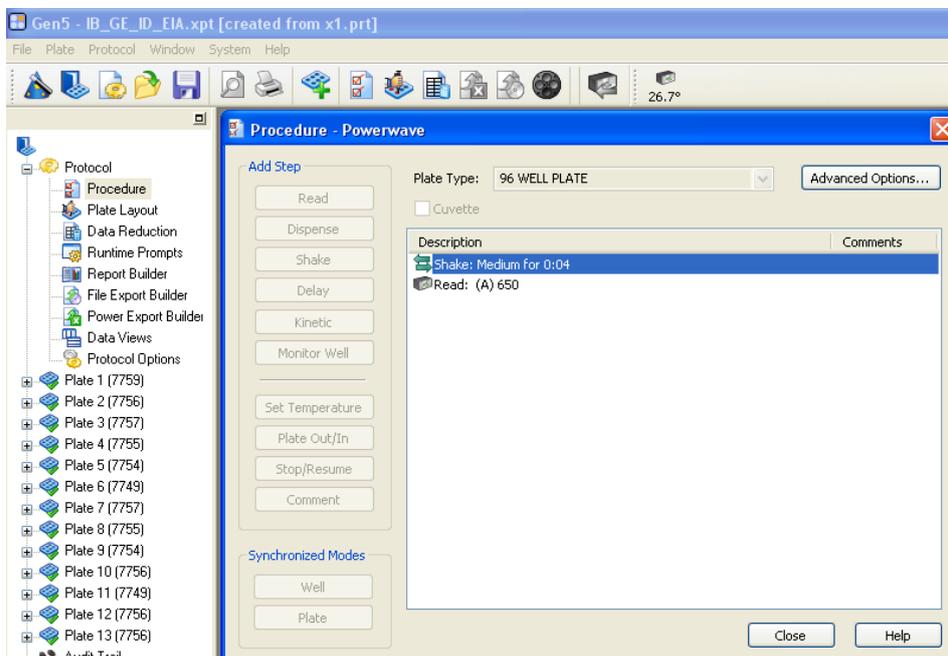


Abbildung 66: Screenshot der Messprozedur für IBRgE.

Die Testplatte wird zunächst für 4 Sekunden geschüttelt und anschließend bei 650nm gemessen.

4.3.2 Plattenlayout

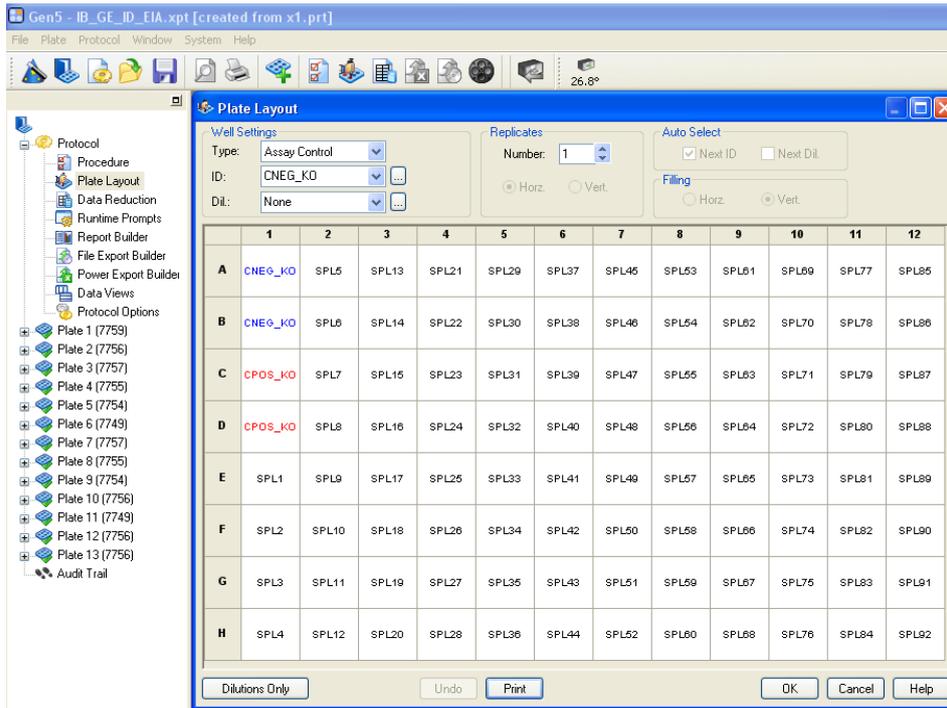


Abbildung 67: Plattenlayout für IBRgE. Die Positionen A1 und B1 sind für die negative Kontrolle, die Positionen C1 und D1 für die positive Kontrolle belegt. Die restlichen Positionen sind als SPL = Sample definiert.

4.3.3 Transformation

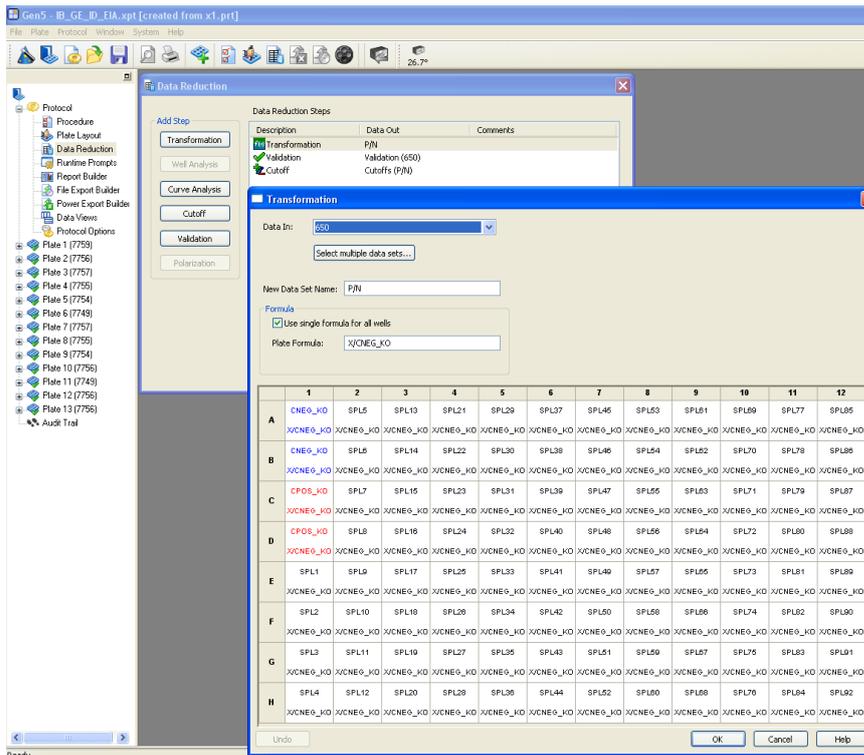


Abbildung 68: Berechnung des P/N – Wertes der Proben für IBRgE. Der Wert der optischen Dichte der Probe wird durch den Mittelwert der optischen Dichte der negativen Kontrollen dividiert.

4.3.4 Validation

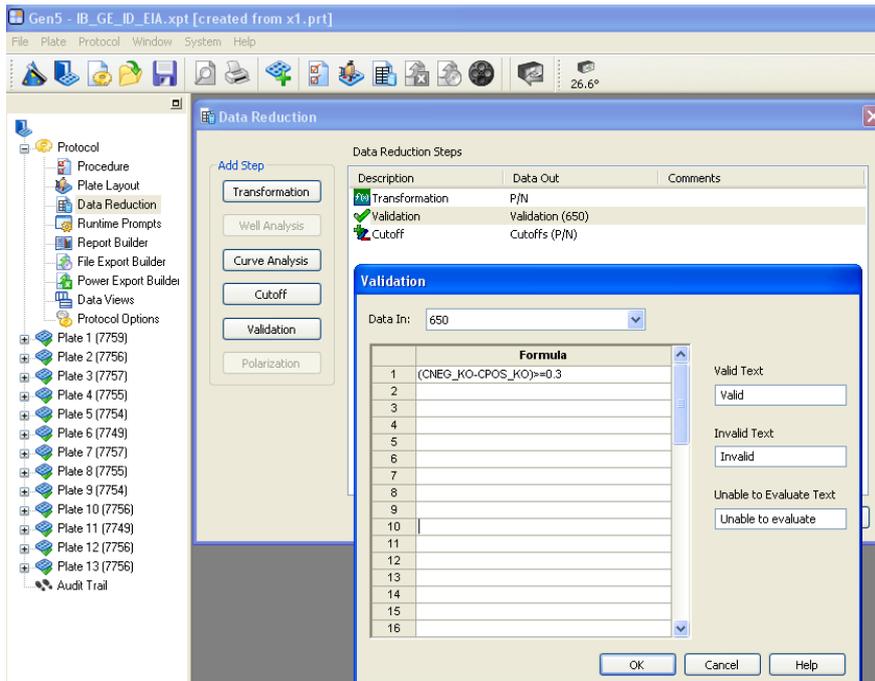


Abbildung 69: Festlegung der Validierungsbedingungen für IBRgE.
 Nur wenn die Differenz zwischen den Mittelwerten der positiven und negativen Kontrollen größer oder gleich 0,3 ist, ist der Test gültig und die Probenergebnisse vertrauensvoll.

4.3.5 CutOFF

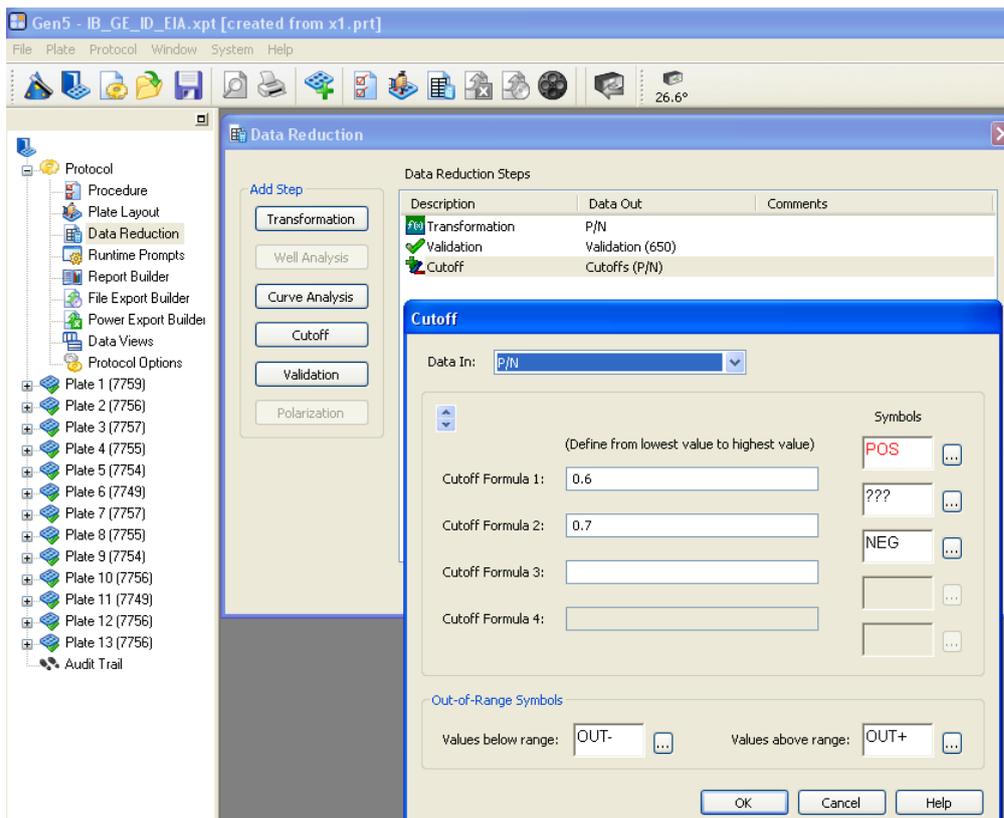


Abbildung 70: Festlegung der Grenzwerte zwischen negativem, fraglichem und positivem Ergebnis der Probe für IBRgE.
 Ist der P/N – Wert der Probe kleiner 0,6 so ist die Probe als positiv zu werten. Bei Werten zwischen 0,6 und 0,7 muss die Probe als fraglich angesehen werden, bei Werten größer als 0,7 als negativ.

4.4 Ergebnistabellen Kontrolle Plattenlayout

4.4.1 BVD Ag

Tabelle 76: Ergebnisse der Validierungsberechnungen für BVD Ag bei Messung mit Tecan Sunrise Photometer. Die Ergebnisse der Kontrollen liegen innerhalb der Validierungsbedingungen, somit ist der Test gültig.

BVD Ag	Messwerte	Mittelwert	Validierung		
	Tecan Sunrise		PCx-NCx	$\geq 0,15$	$NCx \leq 0,250$
negative Kontrolle 1	0,102	0,090	1,578	True	True
negative Kontrolle 2	0,077				
positive Kontrolle 1	1,668	1,667			
positive Kontrolle 2	1,666				

Tabelle 77: Überprüfung der Validierungsberechnung für BVD Ag.

Das Ergebnis der Software stimmt sowohl mit der manuellen Berechnung der Validierungsgrundlagen als auch mit dem Ergebnis des Referenzphotometers Tecan Sunrise überein.

BVD Ag	Messwerte	Mittelwert	Validierung manuell			Validierung Software		
			PCx-NCx	$\geq 0,15$	$NCx \leq 0,250$	PCx-NCx	$\geq 0,15$	$NCx \leq 0,250$
negative Kontrolle 1	0,108	0,093	1,593	True	True	1,593	Valid	Valid
negative Kontrolle 2	0,078							
positive Kontrolle 1	1,686	1,6855						
positive Kontrolle 2	1,685							

Tabelle 78: Überprüfung der S-N – Werte und der Befundungsergebnisse für BVD Ag.

Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der Software und denen der manuellen Berechnungen zeigt deutlich, dass die Berechnungen von der Software korrekt durchgeführt werden und die Befundung nach Vorschrift vorgenommen wird.

BVD Ag	Messwerte	S-N GEN 5	Berechnung manuell	Vergleich	Befundung Gen 5	Befundung manuell
A2	0,099	0,006	0,006	True	NEG	NEG
A3	0,104	0,011	0,011	True	NEG	NEG
A4	0,096	0,003	0,003	True	NEG	NEG
A5	0,093	0,000	0,000	True	NEG	NEG
A6	0,099	0,006	0,006	True	NEG	NEG
A7	0,101	0,008	0,008	True	NEG	NEG
A8	0,118	0,025	0,025	True	NEG	NEG
A9	0,106	0,013	0,013	True	NEG	NEG

A10	0,091	-0,002	-0,002	True	NEG	NEG
A11	0,103	0,010	0,010	True	NEG	NEG
A12	0,124	0,031	0,031	True	NEG	NEG
B2	0,114	0,021	0,021	True	NEG	NEG
B3	0,092	-0,001	-0,001	True	NEG	NEG
B4	0,097	0,004	0,004	True	NEG	NEG
B5	0,076	-0,017	-0,017	True	NEG	NEG
B6	0,109	0,016	0,016	True	NEG	NEG
B7	0,119	0,026	0,026	True	NEG	NEG
B8	0,106	0,013	0,013	True	NEG	NEG
B9	0,088	-0,005	-0,005	True	NEG	NEG
B10	0,100	0,007	0,007	True	NEG	NEG
B11	0,128	0,035	0,035	True	NEG	NEG
B12	0,110	0,017	0,017	True	NEG	NEG
C2	0,122	0,029	0,029	True	NEG	NEG
C3	0,106	0,013	0,013	True	NEG	NEG
C4	0,097	0,004	0,004	True	NEG	NEG
C5	0,097	0,004	0,004	True	NEG	NEG
C6	0,088	-0,005	-0,005	True	NEG	NEG
C7	0,092	-0,001	-0,001	True	NEG	NEG
C8	0,099	0,006	0,006	True	NEG	NEG
C9	0,086	-0,007	-0,007	True	NEG	NEG
C10	1,606	1,513	1,513	True	POS	POS
C11	0,102	0,009	0,009	True	NEG	NEG
C12	0,097	0,004	0,004	True	NEG	NEG
D2	0,100	0,007	0,007	True	NEG	NEG
D3	0,088	-0,005	-0,005	True	NEG	NEG
D4	0,094	0,001	0,001	True	NEG	NEG
D5	0,088	-0,005	-0,005	True	NEG	NEG
D6	0,082	-0,011	-0,011	True	NEG	NEG
D7	0,094	0,001	0,001	True	NEG	NEG
D8	0,108	0,015	0,015	True	NEG	NEG
D9	0,098	0,005	0,005	True	NEG	NEG
D10	0,285	0,192	0,192	True	NEG	NEG
D11	0,097	0,004	0,004	True	NEG	NEG
D12	0,126	0,033	0,033	True	NEG	NEG
E1	0,126	0,033	0,033	True	NEG	NEG
E2	0,081	-0,012	-0,012	True	NEG	NEG
E3	0,088	-0,005	-0,005	True	NEG	NEG
E4	0,109	0,016	0,016	True	NEG	NEG
E5	0,081	-0,012	-0,012	True	NEG	NEG
E6	0,097	0,004	0,004	True	NEG	NEG
E7	0,096	0,003	0,003	True	NEG	NEG
E8	0,089	-0,004	-0,004	True	NEG	NEG
E9	0,089	-0,004	-0,004	True	NEG	NEG
E10	0,088	-0,005	-0,005	True	NEG	NEG

E11	0,103	0,010	0,010	True	NEG	NEG
E12	0,128	0,035	0,035	True	NEG	NEG
F1	1,261	1,168	1,168	True	POS	POS
F2	0,111	0,018	0,018	True	NEG	NEG
F3	0,096	0,003	0,003	True	NEG	NEG
F4	0,102	0,009	0,009	True	NEG	NEG
F5	0,080	-0,013	-0,013	True	NEG	NEG
F6	0,088	-0,005	-0,005	True	NEG	NEG
F7	0,096	0,003	0,003	True	NEG	NEG
F8	0,083	-0,010	-0,010	True	NEG	NEG
F9	0,060	-0,033	-0,033	True	NEG	NEG
F10	0,096	0,003	0,003	True	NEG	NEG
F11	0,095	0,002	0,002	True	NEG	NEG
F12	0,117	0,024	0,024	True	NEG	NEG
G1	0,127	0,034	0,034	True	NEG	NEG
G2	0,108	0,015	0,015	True	NEG	NEG
G3	0,093	0,000	0,000	True	NEG	NEG
G4	0,092	-0,001	-0,001	True	NEG	NEG
G5	0,094	0,001	0,001	True	NEG	NEG
G6	0,090	-0,003	-0,003	True	NEG	NEG
G7	0,090	-0,003	-0,003	True	NEG	NEG
G8	0,080	-0,013	-0,013	True	NEG	NEG
G9	0,072	-0,021	-0,021	True	NEG	NEG
G10	0,116	0,023	0,023	True	NEG	NEG
G11	0,118	0,025	0,025	True	NEG	NEG
G12	0,122	0,029	0,029	True	NEG	NEG
H1	0,151	0,058	0,058	True	NEG	NEG
H2	0,111	0,018	0,018	True	NEG	NEG
H3	0,101	0,008	0,008	True	NEG	NEG
H4	0,099	0,006	0,006	True	NEG	NEG
H5	0,111	0,018	0,018	True	NEG	NEG
H6	0,127	0,034	0,034	True	NEG	NEG
H7	0,096	0,003	0,003	True	NEG	NEG
H8	0,126	0,033	0,033	True	NEG	NEG
H9	0,083	-0,010	-0,010	True	NEG	NEG
H10	0,097	0,004	0,004	True	NEG	NEG
H11	0,098	0,005	0,005	True	NEG	NEG
H12	0,126	0,033	0,033	True	NEG	NEG

Tabelle 79: Vergleich der Ergebnisse für BVD Ag der Photometer Gen5 und Tecan Sunrise.
Trotz einer geringfügigen Abweichung der Messwerte werden identische Befundungsergebnisse erzielt.

BVD Ag	Gen5			Tecan Sunrise			Vergleich	
	Messwerte	S-N	Befundung	Messwerte	S-N	Befundung	Differenz Messwerte	Befundung
A2	0,099	0,006	NEG	0,097	0,008	NEG	0,002	OK
A3	0,104	0,011	NEG	0,101	0,012	NEG	0,003	OK
A4	0,096	0,003	NEG	0,091	0,002	NEG	0,005	OK
A5	0,093	0,000	NEG	0,090	0,001	NEG	0,003	OK
A6	0,099	0,006	NEG	0,092	0,003	NEG	0,007	OK
A7	0,101	0,008	NEG	0,097	0,008	NEG	0,004	OK
A8	0,118	0,025	NEG	0,113	0,024	NEG	0,005	OK
A9	0,106	0,013	NEG	0,101	0,012	NEG	0,005	OK
A10	0,091	-0,002	NEG	0,088	-0,002	NEG	0,003	OK
A11	0,103	0,010	NEG	0,099	0,010	NEG	0,004	OK
A12	0,124	0,031	NEG	0,119	0,030	NEG	0,005	OK
B2	0,114	0,021	NEG	0,109	0,020	NEG	0,005	OK
B3	0,092	-0,001	NEG	0,089	-0,001	NEG	0,003	OK
B4	0,097	0,004	NEG	0,094	0,005	NEG	0,003	OK
B5	0,076	-0,017	NEG	0,072	-0,018	NEG	0,004	OK
B6	0,109	0,016	NEG	0,105	0,016	NEG	0,004	OK
B7	0,119	0,026	NEG	0,112	0,023	NEG	0,007	OK
B8	0,106	0,013	NEG	0,101	0,012	NEG	0,005	OK
B9	0,088	-0,005	NEG	0,085	-0,004	NEG	0,003	OK
B10	0,100	0,007	NEG	0,096	0,007	NEG	0,004	OK
B11	0,128	0,035	NEG	0,123	0,034	NEG	0,005	OK
B12	0,110	0,017	NEG	0,106	0,017	NEG	0,004	OK
C2	0,122	0,029	NEG	0,119	0,030	NEG	0,003	OK
C3	0,106	0,013	NEG	0,102	0,013	NEG	0,004	OK
C4	0,097	0,004	NEG	0,092	0,003	NEG	0,005	OK
C5	0,097	0,004	NEG	0,093	0,004	NEG	0,004	OK
C6	0,088	-0,005	NEG	0,083	-0,006	NEG	0,005	OK
C7	0,092	-0,001	NEG	0,087	-0,003	NEG	0,005	OK
C8	0,099	0,006	NEG	0,095	0,006	NEG	0,004	OK
C9	0,086	-0,007	NEG	0,081	-0,008	NEG	0,005	OK
C10	1,606	1,513	POS	1,578	1,489	POS	0,028	OK
C11	0,102	0,009	NEG	0,097	0,008	NEG	0,005	OK
C12	0,097	0,004	NEG	0,092	0,003	NEG	0,005	OK
D2	0,100	0,007	NEG	0,098	0,009	NEG	0,002	OK
D3	0,088	-0,005	NEG	0,084	-0,005	NEG	0,004	OK
D4	0,094	0,001	NEG	0,091	0,002	NEG	0,003	OK
D5	0,088	-0,005	NEG	0,086	-0,004	NEG	0,002	OK
D6	0,082	-0,011	NEG	0,081	-0,008	NEG	0,001	OK
D7	0,094	0,001	NEG	0,091	0,002	NEG	0,003	OK
D8	0,108	0,015	NEG	0,105	0,016	NEG	0,003	OK

D9	0,098	0,005	NEG	0,095	0,006	NEG	0,003	OK
D10	0,285	0,192	NEG	0,277	0,188	NEG	0,008	OK
D11	0,097	0,004	NEG	0,094	0,005	NEG	0,003	OK
D12	0,126	0,033	NEG	0,122	0,033	NEG	0,004	OK
E1	0,126	0,033	NEG	0,122	0,033	NEG	0,004	OK
E2	0,081	-0,012	NEG	0,078	-0,012	NEG	0,003	OK
E3	0,088	-0,005	NEG	0,086	-0,004	NEG	0,002	OK
E4	0,109	0,016	NEG	0,104	0,015	NEG	0,005	OK
E5	0,081	-0,012	NEG	0,079	-0,011	NEG	0,002	OK
E6	0,097	0,004	NEG	0,094	0,005	NEG	0,003	OK
E7	0,096	0,003	NEG	0,092	0,003	NEG	0,004	OK
E8	0,089	-0,004	NEG	0,086	-0,004	NEG	0,003	OK
E9	0,089	-0,004	NEG	0,085	-0,004	NEG	0,004	OK
E10	0,088	-0,005	NEG	0,087	-0,003	NEG	0,001	OK
E11	0,103	0,010	NEG	0,099	0,010	NEG	0,004	OK
E12	0,128	0,035	NEG	0,124	0,035	NEG	0,004	OK
F1	1,261	1,168	POS	1,244	1,155	POS	0,017	OK
F2	0,111	0,018	NEG	0,106	0,017	NEG	0,005	OK
F3	0,096	0,003	NEG	0,092	0,003	NEG	0,004	OK
F4	0,102	0,009	NEG	0,100	0,011	NEG	0,002	OK
F5	0,080	-0,013	NEG	0,076	-0,014	NEG	0,004	OK
F6	0,088	-0,005	NEG	0,085	-0,004	NEG	0,003	OK
F7	0,096	0,003	NEG	0,092	0,003	NEG	0,004	OK
F8	0,083	-0,010	NEG	0,079	-0,011	NEG	0,004	OK
F9	0,060	-0,033	NEG	0,059	-0,031	NEG	0,001	OK
F10	0,096	0,003	NEG	0,093	0,004	NEG	0,003	OK
F11	0,095	0,002	NEG	0,094	0,005	NEG	0,001	OK
F12	0,117	0,024	NEG	0,114	0,025	NEG	0,003	OK
G1	0,127	0,034	NEG	0,124	0,035	NEG	0,003	OK
G2	0,108	0,015	NEG	0,105	0,016	NEG	0,003	OK
G3	0,093	0,000	NEG	0,090	0,001	NEG	0,003	OK
G4	0,092	-0,001	NEG	0,089	-0,001	NEG	0,003	OK
G5	0,094	0,001	NEG	0,091	0,002	NEG	0,003	OK
G6	0,090	-0,003	NEG	0,087	-0,003	NEG	0,003	OK
G7	0,090	-0,003	NEG	0,086	-0,004	NEG	0,004	OK
G8	0,080	-0,013	NEG	0,076	-0,014	NEG	0,004	OK
G9	0,072	-0,021	NEG	0,069	-0,021	NEG	0,003	OK
G10	0,116	0,023	NEG	0,114	0,025	NEG	0,002	OK
G11	0,118	0,025	NEG	0,114	0,025	NEG	0,004	OK
G12	0,122	0,029	NEG	0,118	0,029	NEG	0,004	OK
H1	0,151	0,058	NEG	0,147	0,058	NEG	0,004	OK
H2	0,111	0,018	NEG	0,108	0,019	NEG	0,003	OK
H3	0,101	0,008	NEG	0,097	0,008	NEG	0,004	OK
H4	0,099	0,006	NEG	0,097	0,008	NEG	0,002	OK
H5	0,111	0,018	NEG	0,106	0,017	NEG	0,005	OK
H6	0,127	0,034	NEG	0,120	0,031	NEG	0,007	OK

H7	0,096	0,003	NEG	0,092	0,003	NEG	0,004	OK
H8	0,126	0,033	NEG	0,122	0,033	NEG	0,004	OK
H9	0,083	-0,010	NEG	0,080	-0,009	NEG	0,003	OK
H10	0,097	0,004	NEG	0,092	0,003	NEG	0,005	OK
H11	0,098	0,005	NEG	0,094	0,005	NEG	0,004	OK
H12	0,126	0,033	NEG	0,121	0,032	NEG	0,005	OK

4.4.2 IBRgB

Tabelle 80: Ergebnisse der Validierungsberechnungen für IBRgB mit Tecan Sunrise Photometer. Die Kontrollen liegen innerhalb der Validierungsbedingungen. Somit ist der Test gültig.

IBRgB	Messwerte Tecan Sunrise	Mittelwert	Validierung			
			NCx	$\geq 0,5$	%Hemmung PCx	$> 80\%$
negative Kontrolle 1	1,205	1,216	1,155	True	95%	True
negative Kontrolle 2	1,227					
positive Kontrolle 1	0,062	0,061				
positive Kontrolle 2	0,060					

Tabelle 81: Überprüfung der Validierungsberechnung für IBRgB.

Das Ergebnis der Software stimmt sowohl mit der manuellen Berechnung der Validierungsgrundlagen als auch mit dem Ergebnis des Referenzphotometers Tecan Sunrise überein.

IBRgB	Messwerte	Mittelwert	Validierung manuell			Validierung Software	
			NCx $\geq 0,500$	%Hemmung PCx	$> 80\%$	NCx	%Hemmung
negative Kontrolle 1	1,213	1,219	True	96%	True	Valid	Valid
negative Kontrolle 2	1,225						
positive Kontrolle 1	0,054	0,052					
positive Kontrolle 2	0,050						

Tabelle 82: Überprüfung der prozentualen Hemmwerte und der Befundungsergebnisse für IBRgB.
 Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der Software und denen der manuellen Berechnungen zeigt deutlich, dass die Berechnungen von der Software korrekt durchgeführt werden und die Befundung nach Vorschrift vorgenommen wird.

IBRgB	Messwerte	% Hemmung GEN 5	Berechnung manuell	Vergleich	Befundung Gen 5
A2	1,075	11,813	11,813	True	NEG
A3	1,128	7,465	7,465	True	NEG
A4	0,988	18,950	18,950	True	NEG
A5	1,086	10,911	10,911	True	NEG
A6	1,161	4,758	4,758	True	NEG
A7	1,127	7,547	7,547	True	NEG
A8	1,099	9,844	9,844	True	NEG
A9	1,195	1,969	1,969	True	NEG
A10	1,175	3,610	3,610	True	NEG
A11	1,035	15,094	15,094	True	NEG
A12	0,973	20,180	20,180	True	NEG
B2	1,126	7,629	7,629	True	NEG
B3	0,830	31,911	31,911	True	NEG
B4	1,133	7,055	7,055	True	NEG
B5	1,071	12,141	12,141	True	NEG
B6	1,060	13,043	13,043	True	NEG
B7	1,161	4,758	4,758	True	NEG
B8	1,160	4,840	4,840	True	NEG
B9	1,122	7,957	7,957	True	NEG
B10	1,000	17,966	17,966	True	NEG
B11	1,070	12,223	12,223	True	NEG
B12	1,112	8,778	8,778	True	NEG
C2	1,080	11,403	11,403	True	NEG
C3	1,162	4,676	4,676	True	NEG
C4	1,108	9,106	9,106	True	NEG
C5	0,988	18,950	18,950	True	NEG
C6	1,108	9,106	9,106	True	NEG
C7	1,066	12,551	12,551	True	NEG
C8	1,115	8,532	8,532	True	NEG
C9	1,218	0,082	0,082	True	NEG
C10	1,202	1,395	1,395	True	NEG
C11	0,024	98,031	98,031	True	POS
C12	1,121	8,039	8,039	True	NEG
D2	1,074	11,895	11,895	True	NEG
D3	1,140	6,481	6,481	True	NEG
D4	1,141	6,399	6,399	True	NEG
D5	1,123	7,875	7,875	True	NEG
D6	0,888	27,153	27,153	True	NEG
D7	1,215	0,328	0,328	True	NEG
D8	1,166	4,348	4,348	True	NEG

D9	1,255	-2,953	-2,953	True	NEG
D10	1,215	0,328	0,328	True	NEG
D11	1,202	1,395	1,395	True	NEG
D12	1,162	4,676	4,676	True	NEG
E1	1,198	1,723	1,723	True	NEG
E2	1,170	4,020	4,020	True	NEG
E3	1,082	11,239	11,239	True	NEG
E4	0,933	23,462	23,462	True	NEG
E5	1,123	7,875	7,875	True	NEG
E6	1,094	10,254	10,254	True	NEG
E7	1,015	16,735	16,735	True	NEG
E8	1,147	5,906	5,906	True	NEG
E9	1,225	-0,492	-0,492	True	NEG
E10	1,068	12,387	12,387	True	NEG
E11	1,200	1,559	1,559	True	NEG
E12	1,193	2,133	2,133	True	NEG
F1	1,144	6,153	6,153	True	NEG
F2	1,184	2,871	2,871	True	NEG
F3	1,054	13,536	13,536	True	NEG
F4	1,016	16,653	16,653	True	NEG
F5	0,968	20,591	20,591	True	NEG
F6	1,079	11,485	11,485	True	NEG
F7	1,082	11,239	11,239	True	NEG
F8	1,253	-2,789	-2,789	True	NEG
F9	0,164	86,546	86,546	True	POS
F10	1,189	2,461	2,461	True	NEG
F11	1,238	-1,559	-1,559	True	NEG
F12	1,138	6,645	6,645	True	NEG
G1	1,134	6,973	6,973	True	NEG
G2	0,008	99,344	99,344	True	POS
G3	1,150	5,660	5,660	True	NEG
G4	1,039	14,766	14,766	True	NEG
G5	1,078	11,567	11,567	True	NEG
G6	1,169	4,102	4,102	True	NEG
G7	1,243	-1,969	-1,969	True	NEG
G8	0,945	22,477	22,477	True	NEG
G9	1,126	7,629	7,629	True	NEG
G10	1,212	0,574	0,574	True	NEG
G11	1,119	8,203	8,203	True	NEG
G12	1,170	4,020	4,020	True	NEG
H1	1,263	-3,610	-3,610	True	NEG
H2	1,031	15,422	15,422	True	NEG
H3	1,230	-0,902	-0,902	True	NEG
H4	1,165	4,430	4,430	True	NEG
H5	1,151	5,578	5,578	True	NEG
H6	1,012	16,981	16,981	True	NEG

H7	1,162	4,676	4,676	True	NEG
H8	1,155	5,250	5,250	True	NEG
H9	1,275	-4,594	-4,594	True	NEG
H10	1,141	6,399	6,399	True	NEG
H11	1,032	15,340	15,340	True	NEG
H12	1,154	5,332	5,332	True	NEG

Tabelle 83: Vergleich der Ergebnisse der Photometer Gen5 und Tecan Sunrise für IBRgB.
Trotz einer geringfügigen Abweichung der Messwerte werden identische Befundungsergebnisse erzielt.

IBRgB	Gen5			Tecan Sunrise			Vergleich	
	Messwerte	% Hemmung	Befundung	Messwerte	% Hemmung	Befundung	Differenz Messwerte	Befundung
A2	1,075	11,813	NEG	1,082	11,020	NEG	-0,007	OK
A3	1,128	7,465	NEG	1,128	7,237	NEG	0,000	OK
A4	0,988	18,950	NEG	0,991	18,503	NEG	-0,003	OK
A5	1,086	10,911	NEG	1,085	10,773	NEG	0,001	OK
A6	1,161	4,758	NEG	1,167	4,030	NEG	-0,006	OK
A7	1,127	7,547	NEG	1,120	7,895	NEG	0,007	OK
A8	1,099	9,844	NEG	1,110	8,717	NEG	-0,011	OK
A9	1,195	1,969	NEG	1,197	1,563	NEG	-0,002	OK
A10	1,175	3,610	NEG	1,176	3,289	NEG	-0,001	OK
A11	1,035	15,094	NEG	1,052	13,487	NEG	-0,017	OK
A12	0,973	20,180	NEG	0,987	18,832	NEG	-0,014	OK
B2	1,126	7,629	NEG	1,124	7,566	NEG	0,002	OK
B3	0,830	31,911	NEG	0,834	31,414	NEG	-0,004	OK
B4	1,133	7,055	NEG	1,139	6,332	NEG	-0,006	OK
B5	1,071	12,141	NEG	1,074	11,678	NEG	-0,003	OK
B6	1,060	13,043	NEG	1,064	12,500	NEG	-0,004	OK
B7	1,161	4,758	NEG	1,158	4,770	NEG	0,003	OK
B8	1,160	4,840	NEG	1,165	4,194	NEG	-0,005	OK
B9	1,122	7,957	NEG	1,126	7,401	NEG	-0,004	OK
B10	1,000	17,966	NEG	1,007	17,188	NEG	-0,007	OK
B11	1,070	12,223	NEG	1,083	10,938	NEG	-0,013	OK
B12	1,112	8,778	NEG	1,127	7,319	NEG	-0,015	OK
C2	1,080	11,403	NEG	1,089	10,444	NEG	-0,009	OK
C3	1,162	4,676	NEG	1,160	4,605	NEG	0,002	OK
C4	1,108	9,106	NEG	1,112	8,553	NEG	-0,004	OK
C5	0,988	18,950	NEG	0,994	18,257	NEG	-0,006	OK
C6	1,108	9,106	NEG	1,116	8,224	NEG	-0,008	OK
C7	1,066	12,551	NEG	1,069	12,089	NEG	-0,003	OK
C8	1,115	8,532	NEG	1,127	7,319	NEG	-0,012	OK
C9	1,218	0,082	NEG	1,220	-0,329	NEG	-0,002	OK
C10	1,202	1,395	NEG	1,215	0,082	NEG	-0,013	OK
C11	0,024	98,031	POS	0,028	97,697	POS	-0,004	OK
C12	1,121	8,039	NEG	1,128	7,237	NEG	-0,007	OK
D2	1,074	11,895	NEG	1,069	12,089	NEG	0,005	OK

D3	1,140	6,481	NEG	1,134	6,743	NEG	0,006	OK
D4	1,141	6,399	NEG	1,141	6,168	NEG	0,000	OK
D5	1,123	7,875	NEG	1,128	7,237	NEG	-0,005	OK
D6	0,888	27,153	NEG	0,901	25,905	NEG	-0,013	OK
D7	1,215	0,328	NEG	1,216	0,000	NEG	-0,001	OK
D8	1,166	4,348	NEG	1,167	4,030	NEG	-0,001	OK
D9	1,255	-2,953	NEG	1,255	-3,207	NEG	0,000	OK
D10	1,215	0,328	NEG	1,230	-1,151	NEG	-0,015	OK
D11	1,202	1,395	NEG	1,217	-0,082	NEG	-0,015	OK
D12	1,162	4,676	NEG	1,172	3,618	NEG	-0,010	OK
E1	1,198	1,723	NEG	1,200	1,316	NEG	-0,002	OK
E2	1,170	4,020	NEG	1,177	3,207	NEG	-0,007	OK
E3	1,082	11,239	NEG	1,081	11,102	NEG	0,001	OK
E4	0,933	23,462	NEG	0,942	22,533	NEG	-0,009	OK
E5	1,123	7,875	NEG	1,129	7,155	NEG	-0,006	OK
E6	1,094	10,254	NEG	1,105	9,128	NEG	-0,011	OK
E7	1,015	16,735	NEG	1,021	16,036	NEG	-0,006	OK
E8	1,147	5,906	NEG	1,168	3,947	NEG	-0,021	OK
E9	1,225	-0,492	NEG	1,237	-1,727	NEG	-0,012	OK
E10	1,068	12,387	NEG	1,089	10,444	NEG	-0,021	OK
E11	1,200	1,559	NEG	1,215	0,082	NEG	-0,015	OK
E12	1,193	2,133	NEG	1,214	0,164	NEG	-0,021	OK
F1	1,144	6,153	NEG	1,146	5,757	NEG	-0,002	OK
F2	1,184	2,871	NEG	1,192	1,974	NEG	-0,008	OK
F3	1,054	13,536	NEG	1,056	13,158	NEG	-0,002	OK
F4	1,016	16,653	NEG	1,023	15,872	NEG	-0,007	OK
F5	0,968	20,591	NEG	0,976	19,737	NEG	-0,008	OK
F6	1,079	11,485	NEG	1,093	10,115	NEG	-0,014	OK
F7	1,082	11,239	NEG	1,089	10,444	NEG	-0,007	OK
F8	1,253	-2,789	NEG	1,255	-3,207	NEG	-0,002	OK
F9	0,164	86,546	POS	0,175	85,609	POS	-0,011	OK
F10	1,189	2,461	NEG	1,195	1,727	NEG	-0,006	OK
F11	1,238	-1,559	NEG	1,256	-3,289	NEG	-0,018	OK
F12	1,138	6,645	NEG	1,148	5,592	NEG	-0,010	OK
G1	1,134	6,973	NEG	1,145	5,839	NEG	-0,011	OK
G2	0,008	99,344	POS	0,009	99,260	POS	-0,001	OK
G3	1,150	5,660	NEG	1,165	4,194	NEG	-0,015	OK
G4	1,039	14,766	NEG	1,057	13,076	NEG	-0,018	OK
G5	1,078	11,567	NEG	1,095	9,951	NEG	-0,017	OK
G6	1,169	4,102	NEG	1,195	1,727	NEG	-0,026	OK
G7	1,243	-1,969	NEG	1,247	-2,549	NEG	-0,004	OK
G8	0,945	22,477	NEG	0,957	21,299	NEG	-0,012	OK
G9	1,126	7,629	NEG	1,138	6,414	NEG	-0,012	OK
G10	1,212	0,574	NEG	1,228	-0,987	NEG	-0,016	OK
G11	1,119	8,203	NEG	1,146	5,757	NEG	-0,027	OK
G12	1,170	4,020	NEG	1,189	2,220	NEG	-0,019	OK

H1	1,263	-3,610	NEG	1,284	-5,592	NEG	-0,021	OK
H2	1,031	15,422	NEG	1,049	13,734	NEG	-0,018	OK
H3	1,230	-0,902	NEG	1,244	-2,303	NEG	-0,014	OK
H4	1,165	4,430	NEG	1,183	2,714	NEG	-0,018	OK
H5	1,151	5,578	NEG	1,167	4,030	NEG	-0,016	OK
H6	1,012	16,981	NEG	1,024	15,789	NEG	-0,012	OK
H7	1,162	4,676	NEG	1,171	3,701	NEG	-0,009	OK
H8	1,155	5,250	NEG	1,171	3,701	NEG	-0,016	OK
H9	1,275	-4,594	NEG	1,278	-5,099	NEG	-0,003	OK
H10	1,141	6,399	NEG	1,158	4,770	NEG	-0,017	OK
H11	1,032	15,340	NEG	1,055	13,240	NEG	-0,023	OK
H12	1,154	5,332	NEG	1,171	3,701	NEG	-0,017	OK

4.4.3 IBRgE

Tabelle 84: Ergebnisse der Validierungsberechnungen IBRgE mit Tecan Sunrise Photometer. Die Kontrollen liegen innerhalb der Validierungsbedingungen, somit ist der Test gültig.

IBRgE	Messwerte Tecan Sunrise	Mittelwert	Validierung (NCx-PCx)	$\geq 0,3$
negative Kontrolle 1	1,091	1,1025	1,037	True
negative Kontrolle 2	1,114			
positive Kontrolle 1	0,066	0,066		
positive Kontrolle 2	0,066			

Tabelle 85: Überprüfung der Validierungsberechnung von Gen5 für IBRgE. Das Ergebnis der Software stimmt sowohl mit der manuellen Berechnung der Validierungsgrundlagen als auch mit dem Ergebnis des Referenzphotometers Tecan Sunrise überein.

IBRgE	Messwerte	Mittelwert	Validierung (NCx-PCx)	$\geq 0,3$	Angabe Software
negative Kontrolle 1	1,092	1,0915	1,042	True	Valid
negative Kontrolle 2	1,091				
positive Kontrolle 1	0,048	0,0495			
positive Kontrolle 2	0,051				

Tabelle 86: Überprüfung der P/N – Werte und der Befundungsergebnisse für IBRgE.

Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der Software und denen der manuellen Berechnungen zeigt deutlich, dass die Berechnungen von der Software korrekt durchgeführt werden und die Befundung nach Vorschrift vorgenommen wird.

IBRgE	Messwerte	P/N - Wert GEN 5	Berechnung Manuell	Vergleich	Befundung Gen 5	Befundung manuell
A2	1,254	1,149	1,149	True	NEG	NEG
A3	1,036	0,949	0,949	True	NEG	NEG
A4	0,610	0,559	0,559	True	POS	POS
A5	1,151	1,055	1,055	True	NEG	NEG
A6	0,723	0,662	0,662	True	???	???
A7	0,943	0,864	0,864	True	NEG	NEG
A8	0,901	0,825	0,825	True	NEG	NEG
A9	0,909	0,833	0,833	True	NEG	NEG
A10	1,356	1,242	1,242	True	NEG	NEG
A11	1,224	1,121	1,121	True	NEG	NEG
A12	0,802	0,735	0,735	True	NEG	NEG
B2	1,164	1,066	1,066	True	NEG	NEG
B3	1,136	1,041	1,041	True	NEG	NEG
B4	0,901	0,825	0,825	True	NEG	NEG
B5	1,041	0,954	0,954	True	NEG	NEG
B6	1,055	0,967	0,967	True	NEG	NEG
B7	1,332	1,220	1,220	True	NEG	NEG
B8	1,060	0,971	0,971	True	NEG	NEG
B9	1,254	1,149	1,149	True	NEG	NEG
B10	1,026	0,940	0,940	True	NEG	NEG
B11	0,971	0,890	0,890	True	NEG	NEG
B12	0,858	0,786	0,786	True	NEG	NEG
C2	0,951	0,871	0,871	True	NEG	NEG
C3	0,948	0,869	0,869	True	NEG	NEG
C4	0,903	0,827	0,827	True	NEG	NEG
C5	1,065	0,976	0,976	True	NEG	NEG
C6	1,017	0,932	0,932	True	NEG	NEG
C7	1,325	1,214	1,214	True	NEG	NEG
C8	1,136	1,041	1,041	True	NEG	NEG
C9	0,945	0,866	0,866	True	NEG	NEG
C10	1,294	1,186	1,186	True	NEG	NEG
C11	1,015	0,930	0,930	True	NEG	NEG
C12	1,105	1,012	1,012	True	NEG	NEG
D2	1,020	0,934	0,934	True	NEG	NEG
D3	0,875	0,802	0,802	True	NEG	NEG
D4	0,927	0,849	0,849	True	NEG	NEG
D5	1,008	0,923	0,923	True	NEG	NEG
D6	0,840	0,770	0,770	True	NEG	NEG
D7	1,145	1,049	1,049	True	NEG	NEG
D8	1,024	0,938	0,938	True	NEG	NEG
D9	0,788	0,722	0,722	True	NEG	NEG

D10	1,304	1,195	1,195	True	NEG	NEG
D11	1,182	1,083	1,083	True	NEG	NEG
D12	1,015	0,930	0,930	True	NEG	NEG
E1	1,050	0,962	0,962	True	NEG	NEG
E2	1,114	1,021	1,021	True	NEG	NEG
E3	1,029	0,943	0,943	True	NEG	NEG
E4	1,102	1,010	1,010	True	NEG	NEG
E5	0,889	0,814	0,814	True	NEG	NEG
E6	0,976	0,894	0,894	True	NEG	NEG
E7	1,033	0,946	0,946	True	NEG	NEG
E8	0,940	0,861	0,861	True	NEG	NEG
E9	1,013	0,928	0,928	True	NEG	NEG
E10	1,052	0,964	0,964	True	NEG	NEG
E11	1,187	1,087	1,087	True	NEG	NEG
E12	0,724	0,663	0,663	True	???	???
F1	1,167	1,069	1,069	True	NEG	NEG
F2	1,018	0,933	0,933	True	NEG	NEG
F3	1,188	1,088	1,088	True	NEG	NEG
F4	0,901	0,825	0,825	True	NEG	NEG
F5	0,920	0,843	0,843	True	NEG	NEG
F6	1,143	1,047	1,047	True	NEG	NEG
F7	0,911	0,835	0,835	True	NEG	NEG
F8	1,093	1,001	1,001	True	NEG	NEG
F9	0,885	0,811	0,811	True	NEG	NEG
F10	0,987	0,904	0,904	True	NEG	NEG
F11	0,793	0,727	0,727	True	NEG	NEG
F12	1,125	1,031	1,031	True	NEG	NEG
G1	1,271	1,164	1,164	True	NEG	NEG
G2	1,129	1,034	1,034	True	NEG	NEG
G3	0,895	0,820	0,820	True	NEG	NEG
G4	1,020	0,934	0,934	True	NEG	NEG
G5	0,895	0,820	0,820	True	NEG	NEG
G6	0,921	0,844	0,844	True	NEG	NEG
G7	1,119	1,025	1,025	True	NEG	NEG
G8	0,980	0,898	0,898	True	NEG	NEG
G9	1,069	0,979	0,979	True	NEG	NEG
G10	1,101	1,009	1,009	True	NEG	NEG
G11	1,059	0,970	0,970	True	NEG	NEG
G12	1,103	1,011	1,011	True	NEG	NEG
H1	1,283	1,175	1,175	True	NEG	NEG
H2	1,070	0,980	0,980	True	NEG	NEG
H3	1,050	0,962	0,962	True	NEG	NEG
H4	0,921	0,844	0,844	True	NEG	NEG
H5	0,997	0,913	0,913	True	NEG	NEG
H6	0,871	0,798	0,798	True	NEG	NEG
H7	1,036	0,949	0,949	True	NEG	NEG

H8	1,092	1,000	1,000	True	NEG	NEG
H9	1,235	1,131	1,131	True	NEG	NEG
H10	1,135	1,040	1,040	True	NEG	NEG
H11	0,561	0,514	0,514	True	POS	POS
H12	1,144	1,048	1,048	True	NEG	NEG

Tabelle 87: Vergleich der Ergebnisse der Photometer Gen5 und Tecan Sunrise für IBRgE. Trotz einer geringfügigen Abweichung der Messwerte werden identische Befundungsergebnisse erzielt.

IBRgE	Messwerte			Messwerte			Vergleich	
	Gen5	P/N - Wert	Befundung	Tecan Sunrise	P/N - Wert	Befundung	Differenz Messwerte	Befundung
A2	1,254	1,149	NEG	1,284	1,165	NEG	-0,030	OK
A3	1,036	0,949	NEG	1,045	0,948	NEG	-0,009	OK
A4	0,610	0,559	POS	0,632	0,573	POS	-0,022	OK
A5	1,151	1,055	NEG	1,168	1,059	NEG	-0,017	OK
A6	0,723	0,662	???	0,747	0,678	???	-0,024	OK
A7	0,943	0,864	NEG	0,967	0,877	NEG	-0,024	OK
A8	0,901	0,825	NEG	0,924	0,838	NEG	-0,023	OK
A9	0,909	0,833	NEG	0,924	0,838	NEG	-0,015	OK
A10	1,356	1,242	NEG	1,386	1,257	NEG	-0,030	OK
A11	1,224	1,121	NEG	1,284	1,165	NEG	-0,060	OK
A12	0,802	0,735	NEG	0,815	0,739	NEG	-0,013	OK
B2	1,164	1,066	NEG	1,227	1,113	NEG	-0,063	OK
B3	1,136	1,041	NEG	1,192	1,081	NEG	-0,056	OK
B4	0,901	0,825	NEG	0,960	0,871	NEG	-0,059	OK
B5	1,041	0,954	NEG	1,071	0,971	NEG	-0,030	OK
B6	1,055	0,967	NEG	1,081	0,980	NEG	-0,026	OK
B7	1,332	1,220	NEG	1,371	1,244	NEG	-0,039	OK
B8	1,060	0,971	NEG	1,082	0,981	NEG	-0,022	OK
B9	1,254	1,149	NEG	1,287	1,167	NEG	-0,033	OK
B10	1,026	0,940	NEG	1,023	0,928	NEG	0,003	OK
B11	0,971	0,890	NEG	1,007	0,913	NEG	-0,036	OK
B12	0,858	0,786	NEG	0,893	0,810	NEG	-0,035	OK
C2	0,951	0,871	NEG	0,982	0,891	NEG	-0,031	OK
C3	0,948	0,869	NEG	0,974	0,883	NEG	-0,026	OK
C4	0,903	0,827	NEG	0,936	0,849	NEG	-0,033	OK
C5	1,065	0,976	NEG	1,085	0,984	NEG	-0,020	OK
C6	1,017	0,932	NEG	1,060	0,961	NEG	-0,043	OK
C7	1,325	1,214	NEG	1,309	1,187	NEG	0,016	OK
C8	1,136	1,041	NEG	1,168	1,059	NEG	-0,032	OK
C9	0,945	0,866	NEG	0,954	0,865	NEG	-0,009	OK
C10	1,294	1,186	NEG	1,323	1,200	NEG	-0,029	OK
C11	1,015	0,930	NEG	1,046	0,949	NEG	-0,031	OK
C12	1,105	1,012	NEG	1,113	1,010	NEG	-0,008	OK
D2	1,020	0,934	NEG	1,062	0,963	NEG	-0,042	OK
D3	0,875	0,802	NEG	0,923	0,837	NEG	-0,048	OK

D4	0,927	0,849	NEG	0,957	0,868	NEG	-0,030	OK
D5	1,008	0,923	NEG	1,015	0,921	NEG	-0,007	OK
D6	0,840	0,770	NEG	0,854	0,775	NEG	-0,014	OK
D7	1,145	1,049	NEG	1,149	1,042	NEG	-0,004	OK
D8	1,024	0,938	NEG	1,045	0,948	NEG	-0,021	OK
D9	0,788	0,722	NEG	0,809	0,734	NEG	-0,021	OK
D10	1,304	1,195	NEG	1,293	1,173	NEG	0,011	OK
D11	1,182	1,083	NEG	1,198	1,087	NEG	-0,016	OK
D12	1,015	0,930	NEG	1,097	0,995	NEG	-0,082	OK
E1	1,050	0,962	NEG	1,101	0,999	NEG	-0,051	OK
E2	1,114	1,021	NEG	1,151	1,044	NEG	-0,037	OK
E3	1,029	0,943	NEG	1,065	0,966	NEG	-0,036	OK
E4	1,102	1,010	NEG	1,112	1,009	NEG	-0,010	OK
E5	0,889	0,814	NEG	0,914	0,829	NEG	-0,025	OK
E6	0,976	0,894	NEG	0,982	0,891	NEG	-0,006	OK
E7	1,033	0,946	NEG	1,061	0,962	NEG	-0,028	OK
E8	0,940	0,861	NEG	0,961	0,872	NEG	-0,021	OK
E9	1,013	0,928	NEG	1,032	0,936	NEG	-0,019	OK
E10	1,052	0,964	NEG	1,082	0,981	NEG	-0,030	OK
E11	1,187	1,087	NEG	1,237	1,122	NEG	-0,050	OK
E12	0,724	0,663	???	0,758	0,688	???	-0,034	OK
F1	1,167	1,069	NEG	1,159	1,051	NEG	0,008	OK
F2	1,018	0,933	NEG	1,027	0,932	NEG	-0,009	OK
F3	1,188	1,088	NEG	1,229	1,115	NEG	-0,041	OK
F4	0,901	0,825	NEG	0,915	0,830	NEG	-0,014	OK
F5	0,920	0,843	NEG	0,949	0,861	NEG	-0,029	OK
F6	1,143	1,047	NEG	1,167	1,059	NEG	-0,024	OK
F7	0,911	0,835	NEG	0,902	0,818	NEG	0,009	OK
F8	1,093	1,001	NEG	1,080	0,980	NEG	0,013	OK
F9	0,885	0,811	NEG	0,885	0,803	NEG	0,000	OK
F10	0,987	0,904	NEG	1,022	0,927	NEG	-0,035	OK
F11	0,793	0,727	NEG	0,795	0,721	NEG	-0,002	OK
F12	1,125	1,031	NEG	1,161	1,053	NEG	-0,036	OK
G1	1,271	1,164	NEG	1,291	1,171	NEG	-0,020	OK
G2	1,129	1,034	NEG	1,158	1,050	NEG	-0,029	OK
G3	0,895	0,820	NEG	0,972	0,882	NEG	-0,077	OK
G4	1,020	0,934	NEG	1,061	0,962	NEG	-0,041	OK
G5	0,895	0,820	NEG	0,928	0,842	NEG	-0,033	OK
G6	0,921	0,844	NEG	0,965	0,875	NEG	-0,044	OK
G7	1,119	1,025	NEG	1,177	1,068	NEG	-0,058	OK
G8	0,980	0,898	NEG	0,991	0,899	NEG	-0,011	OK
G9	1,069	0,979	NEG	1,114	1,010	NEG	-0,045	OK
G10	1,101	1,009	NEG	1,132	1,027	NEG	-0,031	OK
G11	1,059	0,970	NEG	1,100	0,998	NEG	-0,041	OK
G12	1,103	1,011	NEG	1,133	1,028	NEG	-0,030	OK
H1	1,283	1,175	NEG	1,312	1,190	NEG	-0,029	OK

H2	1,070	0,980	NEG	1,072	0,972	NEG	-0,002	OK
H3	1,050	0,962	NEG	1,064	0,965	NEG	-0,014	OK
H4	0,921	0,844	NEG	0,924	0,838	NEG	-0,003	OK
H5	0,997	0,913	NEG	0,979	0,888	NEG	0,018	OK
H6	0,871	0,798	NEG	0,891	0,808	NEG	-0,020	OK
H7	1,036	0,949	NEG	1,037	0,941	NEG	-0,001	OK
H8	1,092	1,000	NEG	1,102	1,000	NEG	-0,010	OK
H9	1,235	1,131	NEG	1,245	1,129	NEG	-0,010	OK
H10	1,135	1,040	NEG	1,143	1,037	NEG	-0,008	OK
H11	0,561	0,514	POS	0,562	0,510	POS	-0,001	OK
H12	1,144	1,048	NEG	1,150	1,043	NEG	-0,006	OK

4.5 Zuordnung Messprogramm – Test

Tabelle 88: Ergebnistabelle Zuordnung Messprogramm.

Bei jedem Assay wurde die korrekte Zuordnung von allen Kriterien bestätigt.

Assay/ MTP	Ausdruck	Messwertdatei	Log-File	Übertragung
BVD Ag				
707052	OK	OK	OK	OK
707053	OK	OK	OK	OK
707066	OK	OK	OK	OK
707067	OK	OK	OK	OK
707068	OK	OK	OK	OK
IBRgB				
124713	OK	OK	OK	OK
124719	OK	OK	OK	OK
125627	OK	OK	OK	OK
125628	OK	OK	OK	OK
125629	OK	OK	OK	OK
IBRgE				
147752	OK	OK	OK	OK
147754	OK	OK	OK	OK
147755	OK	OK	OK	OK
147756	OK	OK	OK	OK
147757	OK	OK	OK	OK
147758	OK	OK	OK	OK

6 Testläufe

Tabelle 89: Ansatzschema horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit.

In die erste Reihe werden Kontrollen gesetzt, um die Validität der Testplatte zu prüfen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NEG											
B	NEG											
C	POS											
D	POS											
E	NEG											
F	NEG											
G	POS											
H	POS											

Legende:

IS 1:40	
negativ Pool	
positiv Pool	

Tabelle 90: Ansatzschema Verteilung über mehrere Testplatten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NEG											
B	NEG											
C	POS											
D	POS											
E												
F												
G												
H												

Legende:

stark positiv	
schwach positiv	
Fraglich	
neg. sample	

6.1 Ergebnistabellen zu 2.4.1

6.1.1 IBRgE

Tabelle 91: Ergebnistabelle horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit IBRgE.

Dargestellt sind die Rohwerte.

142755	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,868	0,512	0,976	0,080	0,479	0,913	0,070	0,466	0,980	0,078	0,475	0,890
B	0,879	0,518	0,986	0,075	0,476	0,882	0,068	0,482	1,066	0,067	0,463	0,887
C	0,063	0,523	0,994	0,071	0,453	0,955	0,066	0,478	0,888	0,070	0,457	0,976
D	0,069	0,507	1,023	0,081	0,503	1,006	0,079	0,504	1,023	0,072	0,498	0,915
E	0,934	0,490	0,955	0,077	0,466	1,016	0,077	0,482	0,974	0,070	0,487	0,961
F	1,041	0,561	1,032	0,082	0,519	1,054	0,082	0,504	1,031	0,079	0,484	0,997
G	0,063	0,552	1,079	0,073	0,523	1,025	0,069	0,519	1,027	0,068	0,575	1,026
H	0,064	0,541	0,950	0,090	0,522	1,071	0,071	0,510	1,023	0,074	0,461	1,102

Tabelle 92: Diskussion horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit IS 1 : 40.

Die Werte innerhalb einer Nadel sind ebenso stabil wie zwischen den Nadeln. Die Proben werden als schwach positiv beurteilt.

IS 1 : 40	P/N Werte						zufällige Messabweichung
>0,6<0,7	2	5	8	11	Mittelwerte		
A	0,586	0,548	0,533	0,544	0,553	0,02	
B	0,593	0,545	0,552	0,530	0,555	0,03	
C	0,599	0,519	0,547	0,523	0,547	0,04	
D	0,580	0,576	0,577	0,570	0,576	0,00	
E	0,561	0,533	0,552	0,558	0,551	0,01	
F	0,642	0,594	0,577	0,554	0,592	0,04	
G	0,632	0,599	0,594	0,658	0,621	0,03	
H	0,619	0,598	0,584	0,528	0,582	0,04	
Mittelwert	0,602	0,564	0,565	0,558	0,572	0,02	
zufällige Messabweichung	0,03	0,03	0,02	0,04	0,03		

Tabelle 93: Diskussion horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit negativ Pool.

Die Werte innerhalb einer Nadel sind ebenso stabil wie zwischen den Nadeln. Die Proben werden als stark negativ beurteilt.

negativ Pool	P/N Werte						zufällige Messabweichung
>0,7	3	6	9	12	Mittelwerte		
A	1,117	1,045	1,122	1,019	1,076	0,05	
B	1,129	1,010	1,220	1,015	1,094	0,10	
C	1,138	1,093	1,017	1,117	1,091	0,05	
D	1,171	1,152	1,171	1,048	1,135	0,06	
E	1,093	1,163	1,115	1,100	1,118	0,03	
F	1,181	1,207	1,180	1,141	1,177	0,03	
G	1,235	1,173	1,176	1,175	1,190	0,03	
H	1,088	1,226	1,171	1,262	1,187	0,08	
Mittelwert	1,144	1,134	1,147	1,110	1,133	0,02	
zufällige Messabweichung	0,05	0,08	0,06	0,08	0,05		

Tabelle 94: Diskussion horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit positiv Pool.

Die Werte innerhalb einer Nadel sind ebenso stabil wie zwischen den Nadeln. Die Proben werden als stark positiv beurteilt.

positiv Pool	P/N Werte				
<0,6	4	7	10	Mittelwerte	zufällige Messabweichung
A	0,092	0,080	0,089	0,087	0,01
B	0,086	0,078	0,077	0,080	0,00
C	0,081	0,076	0,080	0,079	0,00
D	0,093	0,090	0,082	0,089	0,01
E	0,088	0,088	0,080	0,085	0,00
F	0,094	0,094	0,090	0,093	0,00
G	0,084	0,079	0,078	0,080	0,00
H	0,103	0,081	0,085	0,090	0,01
Mittelwert	0,090	0,083	0,083	0,085	0,00
zufällige Messabweichung	0,01	0,01	0,01	0,01	

Tabelle 95: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142756.

142756	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,989	0,603	0,090	0,287	0,603	1,247	1,179	0,087	0,291	0,640	1,175	1,134
B	1,011	0,315	0,621	0,089	0,281	1,117	0,586	1,220	0,082	0,290	0,589	1,104
C	0,064	0,091	0,304	0,607	0,084	1,254	1,212	0,591	1,152	0,083	0,294	0,597
D	0,073	1,325	0,097	0,308	0,620	1,224	0,093	0,320	0,614	1,203	0,091	0,317
E	0,628	1,188	1,242	0,090	0,307	0,623	1,177	0,095	0,299	0,601	1,131	0,091
F	0,321	0,647	1,257	1,175	0,097	0,300	1,172	1,234	0,089	0,291	0,596	1,161
G	0,091	0,304	0,631	1,181	1,205	0,084	1,192	0,611	1,267	0,082	0,273	1,306
H	0,977	0,097	0,329	0,611	1,220	1,234	1,292	0,301	0,618	1,259	0,091	0,294

Tabelle 96: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142757.

142757	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,956	0,560	0,086	0,273	0,530	1,029	1,073	0,080	0,254	0,560	1,060	1,077
B	1,044	0,273	0,618	0,082	0,279	1,114	0,555	1,078	0,075	0,263	0,551	1,068
C	0,059	0,083	0,294	0,614	0,080	1,152	1,074	0,533	1,144	0,080	0,263	0,595
D	0,072	1,077	0,091	0,280	0,590	1,192	0,090	0,299	0,542	1,195	0,083	0,275
E	0,619	1,169	1,149	0,087	0,276	0,568	1,088	0,087	0,265	0,550	1,100	0,091
F	0,305	0,622	1,159	1,156	0,089	0,277	1,136	1,188	0,082	0,277	0,604	1,211
G	0,085	0,294	0,607	1,223	1,164	0,078	1,239	0,612	1,143	0,077	0,279	1,215
H	1,036	0,093	0,283	0,583	1,176	1,202	1,184	0,282	0,579	1,191	0,089	0,315

Tabelle 97: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142758.

142758	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,012	0,698	0,107	0,320	0,654	1,303	1,369	0,104	0,361	0,710	1,481	1,530
B	0,988	0,289	0,625	0,098	0,327	1,302	0,660	1,428	0,097	0,342	0,716	1,495
C	0,085	0,098	0,314	0,597	0,101	1,382	1,417	0,750	1,511	0,101	0,357	0,729
D	0,090	1,309	0,107	0,324	0,665	1,423	0,113	0,351	0,704	1,466	0,110	0,361
E	0,668	1,319	1,293	0,106	0,329	0,715	1,561	0,120	0,414	0,762	1,420	0,116
F	0,377	0,723	1,362	1,282	0,110	0,332	1,476	1,482	0,114	0,351	0,735	1,542
G	0,113	0,382	0,700	1,415	1,329	0,097	1,434	0,754	1,560	0,101	0,364	1,592
H	0,787	0,131	0,345	0,660	1,341	1,379	1,495	0,376	0,784	1,601	0,126	0,380

Tabelle 98: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142759.

142759	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,979	0,586	0,084	0,247	0,540	1,052	1,123	0,077	0,266	0,542	1,141	1,064
B	1,021	0,272	0,517	0,078	0,251	1,114	0,508	1,126	0,068	0,248	0,513	1,067
C	0,058	0,082	0,257	0,578	0,075	1,100	1,139	0,525	1,122	0,076	0,251	0,554
D	0,067	1,163	0,085	0,287	0,590	1,152	0,084	0,293	0,515	1,225	0,079	0,259
E	0,578	1,229	1,187	0,078	0,271	0,525	1,121	0,081	0,276	0,516	1,022	0,077
F	0,305	0,579	1,145	1,186	0,087	0,263	1,086	1,123	0,081	0,263	0,544	1,159
G	0,080	0,273	0,590	1,151	1,120	0,072	1,057	0,544	1,157	0,073	0,262	1,195
H	1,131	0,107	0,274	0,556	1,134	1,167	1,158	0,275	0,584	1,177	0,090	0,290

Tabelle 99: P/N-Werte Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz bei IBRgE, 142760, manuelle Abarbeitung.

142760	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,018	0,559	0,105	0,287	0,581	1,258	1,293	0,109	0,281	0,562	1,264	1,259
B	0,982	0,287	0,550	0,106	0,290	1,276	0,540	1,289	0,109	0,306	0,605	1,220
C	0,089	0,105	0,294	0,563	0,106	1,279	1,233	0,554	1,259	0,112	0,287	0,579
D	0,090	1,231	0,115	0,291	0,572	1,268	0,102	0,294	0,578	1,273	0,112	0,281
E	0,578	1,261	1,311	0,102	0,288	0,559	1,236	0,109	0,296	0,606	1,271	0,195
F	0,310	0,576	1,308	1,295	0,123	0,279	1,239	1,256	0,108	0,306	0,591	1,222
G	0,106	0,296	0,551	1,252	1,298	0,109	1,317	0,587	1,307	0,114	0,307	1,373
H	1,305	0,108	0,293	0,590	1,347	1,361	1,333	0,300	0,618	1,404	0,106	0,299

6.1.2 BVD Ag

Tabelle 100: Testläufe BVD Ag.

MTP 702829 gehört zum Versuch ‚horizontale und vertikale Reproduzierbarkeit‘, alle anderen zu ‚Reproduzierbarkeit im Mehrfachansatz‘. MTP 702834 wurde manuell abgearbeitet und dient somit als Referenz zu 702835-38. Bei MTP 702829 und 702835 sind die positiven Kontrollen als negativ zu bewerten. Bei den MTP 702837-702838 sind die negativen Kontrollen als positiv zu bewerten. Daher ist die Bewertung der Proben nicht valide.

		OD Corr 450nm						
		702829		702835	702836	702837	702838	702834
A1	CNEG_KO	-0,172	CNEG_KO	0,117	0,155	0,888	0,357	0,060
A2	333333	-0,184	333334	0,253	0,388	0,307	0,482	0,459
A3	444444	-0,014	111111	1,370	3,498	3,632	3,634	3,569
A4	111111	2,298	222222	0,055	0,215	0,247	0,283	0,270
A5	333333	0,215	333333	0,049	0,120	0,145	0,171	0,152
A6	444444	0,097	444444	0,020	0,050	0,083	0,054	0,042
A7	111111	2,999	444444	0,019	0,048	0,056	0,058	0,040
A8	333333	0,072	111111	3,261	3,588	3,703	3,733	3,587
A9	444444	0,011	222222	0,214	0,292	0,325	0,354	0,278
A10	111111	3,174	333333	0,118	0,166	0,183	0,194	0,141
A11	333333	0,014	444444	0,037	0,060	0,058	0,065	0,043
A12	444444	0,001	444444	0,044	0,048	0,079	0,064	0,045
B1	CNEG_KO	-0,127	CNEG_KO	0,173	0,059	0,084	0,069	0,059
B2	333333	-0,049	222222	0,069	0,300	0,375	0,318	0,260
B3	444444	0,025	333334	0,252	0,481	0,520	0,520	0,422
B4	111111	2,402	111111	2,935	3,611	3,622	3,763	3,546
B5	333333	0,121	222222	0,227	0,300	0,301	0,317	0,249
B6	444444	0,040	444444	0,029	0,040	0,041	0,043	0,028
B7	111111	3,268	333333	0,151	0,151	0,163	0,180	0,122
B8	333333	0,151	444444	0,040	0,040	0,042	0,044	0,035
B9	444444	0,038	111111	3,661	3,666	3,766	3,791	3,525
B10	111111	3,584	222222	0,322	0,310	0,333	0,338	0,277
B11	333333	0,198	333333	0,184	0,179	0,170	0,186	0,128
B12	444444	0,044	444444	0,056	0,050	0,053	0,055	0,046

C1	CPOS_KO	-0,360	CPOS_KO	-0,008	0,818	0,823	0,881	0,782
C2	333333	-0,007	111111	2,853	3,587	3,539	3,659	3,532
C3	444444	0,028	222222	0,219	0,290	0,292	0,303	0,245
C4	111111	2,575	333334	0,412	0,494	0,506	0,533	0,406
C5	333333	0,123	111111	3,104	3,630	3,627	3,768	3,475
C6	444444	0,035	444444	0,036	0,039	0,040	0,043	0,040
C7	111111	3,581	444444	0,038	0,036	0,038	0,043	0,033
C8	333333	0,170	333333	0,162	0,160	0,163	0,164	0,127
C9	444444	0,033	444444	0,036	0,036	0,038	0,043	0,031
C10	111111	3,694	111111	3,707	3,821	3,858	3,923	3,526
C11	333333	0,168	222222	0,316	0,324	0,323	0,329	0,225
C12	444444	0,050	333333	0,179	0,187	0,180	0,194	0,146
D1	CPOS_KO	-0,325	CPOS_KO	0,033	0,818	0,660	0,887	0,774
D2	333333	0,016	444444	0,021	0,033	0,035	0,037	0,035
D3	444444	0,023	111111	2,880	3,448	3,426	3,660	3,401
D4	111111	2,714	222222	0,245	0,287	0,301	0,297	0,243
D5	333333	0,116	333334	0,425	0,451	0,499	0,532	0,409
D6	444444	0,029	444444	0,031	0,033	0,036	0,038	0,037
D7	111111	3,638	111111	3,627	3,716	3,748	3,810	3,593
D8	333333	0,155	222222	0,313	0,296	0,313	0,317	0,248
D9	444444	0,030	333333	0,150	0,145	0,151	0,160	0,124
D10	111111	3,652	444444	0,031	0,032	0,032	0,036	0,031
D11	333333	0,158	111111	3,707	3,756	3,795	3,845	3,318
D12	444444	0,040	222222	0,329	0,340	0,342	0,349	0,269
E1	555555	-0,022	333333	0,002	0,161	0,174	0,168	0,142
E2	333333	0,019	444444	0,021	0,034	0,033	0,037	0,034
E3	444444	0,025	444444	0,026	0,029	0,029	0,035	0,034
E4	111111	2,665	111111	2,743	3,321	3,254	3,506	3,093
E5	333333	0,118	222222	0,245	0,272	0,290	0,297	0,243
E6	444444	0,026	333334	0,445	0,446	0,475	0,510	0,396
E7	111111	3,604	444444	0,029	0,027	0,032	0,035	0,031
E8	333333	0,142	111111	3,639	3,762	3,745	3,846	3,541
E9	444444	0,031	222222	0,298	0,288	0,298	0,313	0,236
E10	111111	3,591	333333	0,142	0,138	0,151	0,151	0,119
E11	333333	0,156	444444	0,037	0,038	0,036	0,042	0,032
E12	444444	0,042	111111	3,723	3,807	3,770	3,888	3,402
F1	555555	-0,026	222222	-0,001	0,311	0,321	0,320	0,264
F2	333333	-0,010	333333	0,007	0,147	0,148	0,156	0,126
F3	444444	0,024	444444	0,015	0,031	0,031	0,035	0,031
F4	111111	2,622	444444	0,022	0,029	0,032	0,033	0,033
F5	333333	0,118	111111	2,683	3,088	3,168	3,312	3,068
F6	444444	0,029	222222	0,266	0,280	0,294	0,307	0,236
F7	111111	3,444	444444	0,031	0,031	0,031	0,036	0,034
F8	333333	0,137	444444	0,030	0,031	0,033	0,036	0,035
F9	444444	0,030	111111	3,681	3,631	3,779	3,753	3,409
F10	111111	3,305	222222	0,301	0,288	0,306	0,313	0,239
F11	333333	0,155	333333	0,158	0,158	0,157	0,167	0,122
F12	444444	0,041	444444	0,045	0,042	0,046	0,047	0,039
G1	666666	-0,403	111111	1,261	3,517	3,833	3,599	3,567
G2	333333	-0,071	222222	0,133	0,295	0,444	0,322	0,249
G3	444444	0,049	333333	0,082	0,148	0,231	0,168	0,122
G4	111111	2,586	444444	0,027	0,034	0,086	0,041	0,036
G5	333333	0,122	444444	0,032	0,032	0,064	0,040	0,034
G6	444444	0,040	111111	2,570	2,962	2,884	3,179	2,883
G7	111111	3,151	444444	0,041	0,040	0,051	0,044	0,037
G8	333333	0,142	333333	0,151	0,146	0,162	0,160	0,126

G9	444444	0,039	444444	0,045	0,037	0,043	0,046	0,040
G10	111111	3,417	111111	3,623	3,662	3,795	3,815	3,389
G11	333333	0,183	222222	0,327	0,324	0,325	0,348	0,241
G12	444444	0,056	444444	0,057	0,045	0,051	0,056	0,039
H1	666666	-0,323	444444	0,109	0,162	0,993	0,428	0,042
H2	333333	-0,177	111111	0,407	3,502	3,913	3,672	3,438
H3	444444	-0,041	222222	0,204	0,310	0,594	0,417	0,235
H4	111111	2,312	333333	0,066	0,181	0,308	0,261	0,125
H5	333333	0,166	444444	0,024	0,085	0,129	0,099	0,036
H6	444444	0,025	444444	0,018	0,069	0,123	0,108	0,036
H7	111111	2,071	444444	0,016	0,084	0,101	0,103	0,034
H8	333333	0,016	222222	0,098	0,318	0,339	0,368	0,234
H9	444444	0,004	333333	0,069	0,179	0,196	0,234	0,123
H10	111111	1,726	444444	0,033	0,069	0,137	0,090	0,039
H11	333333	0,002	111111	3,631	3,733	3,790	3,844	3,331
H12	444444	0,002	222222	0,279	0,357	0,393	0,405	0,242

Tabelle 101: Daten Washerprüfung.

Die MTP 702847 wurde nur mit Washer 1, 702848 nur mit Washer 2 und 702849 nur mit Washer 3 gewaschen.

		702847		702848		702849	
		OD Corr	S-N Wert	OD Corr	S-N Wert	OD Corr	S-N Wert
		450		450		450	
A1	CNEG_KO	0,067	0,002	0,088	0,005	0,077	0,001
A2	333334	0,545	0,480	0,585	0,502	0,561	0,485
A3	111111	3,912	3,847	3,963	3,880	3,909	3,833
A4	222222	0,339	0,274	0,344	0,261	0,334	0,259
A5	333333	0,173	0,108	0,198	0,115	0,194	0,118
A6	444444	0,040	-0,025	0,057	-0,026	0,053	-0,023
A7	444444	0,047	-0,018	0,065	-0,018	0,058	-0,018
A8	111111	3,840	3,775	3,951	3,868	3,892	3,817
A9	222222	0,333	0,268	0,348	0,265	0,354	0,279
A10	333333	0,168	0,103	0,195	0,112	0,177	0,101
A11	444444	0,042	-0,023	0,062	-0,021	0,054	-0,022
A12	444444	0,048	-0,017	0,069	-0,014	0,057	-0,019
B1	CNEG_KO	0,063	-0,002	0,078	-0,005	0,074	-0,002
B2	222222	0,308	0,243	0,319	0,236	0,320	0,244
B3	333334	0,542	0,477	0,559	0,476	0,534	0,459
B4	111111	3,895	3,830	3,916	3,833	3,876	3,801
B5	222222	0,328	0,263	0,332	0,249	0,353	0,277
B6	444444	0,036	-0,029	0,048	-0,035	0,048	-0,028
B7	333333	0,150	0,085	0,167	0,084	0,164	0,088
B8	444444	0,036	-0,029	0,047	-0,036	0,044	-0,032
B9	111111	3,942	3,877	3,912	3,829	3,914	3,839
B10	222222	0,326	0,261	0,317	0,234	0,328	0,252
B11	333333	0,157	0,092	0,185	0,102	0,165	0,089
B12	444444	0,051	-0,014	0,062	-0,021	0,060	-0,016
C1	CPOS_KO	0,962	0,897	1,014	0,931	0,936	0,860
C2	111111	3,694	3,629	3,794	3,711	3,700	3,625
C3	222222	0,322	0,257	0,342	0,259	0,341	0,265
C4	333334	0,523	0,458	0,549	0,466	0,519	0,444
C5	111111	3,910	3,845	3,903	3,820	3,948	3,873
C6	444444	0,069	0,004	0,086	0,003	0,045	-0,030
C7	444444	0,036	-0,029	0,046	-0,037	0,040	-0,036
C8	333333	0,151	0,086	0,163	0,080	0,155	0,079
C9	444444	0,038	-0,027	0,043	-0,040	0,041	-0,035
C10	111111	3,978	3,913	4,024	3,941	3,946	3,871

C11	222222	0,313	0,248	0,343	0,260	0,323	0,247
C12	333333	0,176	0,111	0,209	0,126	0,185	0,109
D1	CPOS_KO	0,911	0,846	1,009	0,926	0,921	0,845
D2	444444	0,047	-0,018	0,058	-0,025	0,051	-0,025
D3	111111	3,818	3,753	3,821	3,738	3,785	3,709
D4	222222	0,319	0,254	0,302	0,219	0,291	0,216
D5	333334	0,514	0,449	0,540	0,457	0,517	0,442
D6	444444	0,036	-0,029	0,049	-0,034	0,037	-0,039
D7	111111	3,924	3,859	3,923	3,840	3,888	3,813
D8	222222	0,308	0,243	0,307	0,224	0,319	0,243
D9	333333	0,143	0,078	0,157	0,074	0,277	0,202
D10	444444	0,031	-0,034	0,043	-0,040	0,031	-0,045
D11	111111	3,908	3,843	3,891	3,808	3,920	3,845
D12	222222	0,337	0,272	0,375	0,292	0,325	0,250
E1	333333	0,147	0,082	0,177	0,094	0,168	0,092
E2	444444	0,036	-0,029	0,048	-0,035	0,036	-0,040
E3	444444	0,035	-0,030	0,046	-0,037	0,035	-0,041
E4	111111	3,556	3,491	3,700	3,617	3,541	3,466
E5	222222	0,324	0,259	0,328	0,245	0,329	0,254
E6	333334	0,482	0,417	0,523	0,440	0,498	0,423
E7	444444	0,033	-0,032	0,043	-0,040	0,038	-0,038
E8	111111	3,807	3,742	3,944	3,861	3,800	3,725
E9	222222	0,304	0,239	0,320	0,237	0,318	0,242
E10	333333	0,145	0,080	0,164	0,081	0,144	0,069
E11	444444	0,034	-0,031	0,050	-0,033	0,040	-0,036
E12	111111	3,973	3,908	4,038	3,955	3,972	3,897
F1	222222	0,289	0,224	0,319	0,236	0,305	0,230
F2	333333	0,148	0,083	0,160	0,077	0,159	0,084
F3	444444	0,034	-0,031	0,046	-0,037	0,036	-0,040
F4	444444	0,032	-0,033	0,044	-0,039	0,036	-0,040
F5	111111	3,600	3,535	3,562	3,479	3,666	3,591
F6	222222	0,300	0,235	0,325	0,242	0,278	0,203
F7	444444	0,035	-0,030	0,044	-0,039	0,039	-0,037
F8	444444	0,036	-0,029	0,046	-0,037	0,039	-0,037
F9	111111	3,868	3,803	3,864	3,781	3,930	3,855
F10	222222	0,301	0,236	0,315	0,232	0,309	0,233
F11	333333	0,156	0,091	0,168	0,085	0,151	0,076
F12	444444	0,047	-0,018	0,059	-0,024	0,051	-0,025
G1	111111	3,810	3,745	3,896	3,813	3,826	3,751
G2	222222	0,325	0,260	0,346	0,263	0,347	0,271
G3	333333	0,153	0,088	0,172	0,089	0,157	0,081
G4	444444	0,038	-0,027	0,051	-0,032	0,041	-0,035
G5	444444	0,038	-0,027	0,052	-0,031	0,042	-0,034
G6	111111	3,292	3,227	3,366	3,283	3,425	3,350
G7	444444	0,059	-0,006	0,065	-0,018	0,057	-0,019
G8	333333	0,157	0,092	0,166	0,083	0,153	0,077
G9	444444	0,041	-0,024	0,048	-0,035	0,047	-0,029
G10	111111	3,909	3,844	4,013	3,930	3,883	3,808
G11	222222	0,323	0,258	0,338	0,255	0,310	0,235
G12	444444	0,050	-0,015	0,067	-0,016	0,057	-0,019
H1	444444	0,044	-0,021	0,068	-0,015	0,056	-0,020
H2	111111	3,827	3,762	4,030	3,947	3,720	3,645
H3	222222	0,344	0,279	0,363	0,280	0,340	0,265
H4	333333	0,165	0,100	0,183	0,100	0,169	0,094
H5	444444	0,048	-0,017	0,062	-0,021	0,048	-0,028
H6	444444	0,041	-0,024	0,054	-0,029	0,044	-0,032

H7	444444	0,043	-0,022	0,056	-0,027	0,044	-0,032
H8	222222	0,315	0,250	0,328	0,245	0,311	0,236
H9	333333	0,167	0,102	0,188	0,105	0,168	0,092
H10	444444	0,047	-0,018	0,064	-0,019	0,053	-0,023
H11	111111	4,013	3,948	3,955	3,872	4,007	3,931
H12	222222	0,352	0,287	0,379	0,296	0,343	0,268

Tabelle 102: Messwerte MTP 2.

Die OD in Reihe A, H und Position G1 sind gegenüber den anderen Kavitäten deutlich erhöht.

MTP												
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4,071	0,983	0,312	0,248	0,212	0,169	0,162	0,144	0,154	0,140	0,154	0,133
B	0,047	0,043	0,040	0,040	0,040	0,040	0,041	0,041	0,042	0,042	0,040	0,040
C	0,046	0,041	0,040	0,040	0,040	0,040	0,041	0,041	0,040	0,042	0,042	0,040
D	0,047	0,039	0,040	0,040	0,039	0,041	0,036	0,035	0,040	0,042	0,040	0,041
E	0,047	0,041	0,040	0,041	0,042	0,034	0,035	0,039	0,041	0,041	0,041	0,042
F	0,047	0,040	0,039	0,039	0,040	0,031	0,034	0,043	0,040	0,039	0,041	0,041
G	0,102	0,049	0,042	0,041	0,041	0,034	0,042	0,037	0,040	0,043	0,041	0,042
H	4,266	1,658	0,355	0,199	0,164	0,138	0,129	0,128	0,127	0,108	0,104	0,113

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Außerdem versichere ich, dass ich die allgemeinen Prinzipien wissenschaftlicher Arbeit und Veröffentlichung, wie sie in den Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg festgelegt sind, befolgt habe.

Jessica Wigbers